



EXPOSIÇÃO E ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM MANJERICÃO (*Ocimum basilicum*)

Ana Catarina Marques Montez

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Coorientador: Mestre Filipa Rego Pinto

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Vice-Presidente do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos os que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, nomeadamente:

Ao dedicado e incansável Professor Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, pela atenção, compreensão, disponibilidade e principalmente paciência ao longo de todo o trabalho.

Em especial, à Mestre Filipa Pinto por ser a minha coorientadora, pela amizade, ajuda e por transmitir todo o seu conhecimento no laboratório e ao longo do trabalho. À Mestre Joana Sales pela sua amizade, dedicação e paciência. Também à Mestre Inês Moreira e ao resto do laboratório pela boa disposição demonstrada.

Ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, sobretudo à Unidade de Investigação em Química Ambiental (UIQA) pela facilitação de meios e condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao senhor Felício pela ajuda durante o ensaio no Horto.

Aos meus pais, irmão e avó pelo incentivo, esforço, ajuda, apoio, carinho e paciência demonstrados em todos os momentos na realização deste trabalho e do curso, pois sem eles isto tudo não seria possível.

À minha melhor amiga Andreia pela sua ajuda incansável, carinho, apoio, dedicação e amizade transmitida ao longo deste ciclo.

Os meus amigos Diogo Cruz, Tiago Barroso e Raquel Falcato por sempre estarem presentes, pelo apoio, incentivo e boa disposição passados ao longo deste trabalho.

Ao meu namorado, pelo grande apoio, dedicação, carinho e muita paciência transmitida, para eu seguir em frente com os meus objetivos.

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se o efeito da exposição de manjerição (*Ocimum basilicum*) a elementos potencialmente tóxicos (PTE) e ao efeito da salinidade, através da análise de vários parâmetros como a biomassa, o teor de matéria seca, o teor de clorofila e composição mineral.

Foram aplicadas separadamente soluções contendo Cd, Cu, As e NaCl a manjerição com 20 dias de desenvolvimento. A exposição ao As e NaCl causaram uma diminuição significativa da quantidade de biomassa e indicou uma elevada sensibilidade à salinidade. Apenas as folhas contaminadas com Cd diminuíram consideravelmente o teor de matéria seca, comparativamente às amostras de controlo. Nas plantas contaminadas com Cd, observaram-se alterações visuais na pigmentação das folhas (cloroses), facto comprovado pelo aparelho *Hansatech*.

Verificou-se a acumulação de PTE na parte edível das plantas, que apresentaram valores de contaminação, ao fim de 52 dias, superiores aos limites estabelecidos por lei para produtos hortícolas de folha, especialmente para o Cd e As. Relativamente ao Cu e como metal essencial, a concentração deste elemento só ultrapassou os limites por lei após 73 dias de exposição e apenas para as amostras contaminadas com Cu.

Palavras-chave: Manjerição, *Ocimum basilicum*, arsénio, cádmio, cobre, salinidade.

ABSTRACT

In this project the effects of the exposure of basil (*Ocimum basilicum*) to potentially toxic elements (PTE) were studied as well as the effects of salinity, through the analysis of different parameters such as biomass, dry matter and chlorophyll contents and mineral composition.

Basil with 20 days growth was exposed to solutions containing Cd, Cu, As and NaCl. The exposure to As and NaCl led to a significant decrease in the quantity of biomass and it evidenced a high sensibility to salinity. Only the leaves contaminated with Cd showed a considerable decrease in the dry matter content, when compared to the control samples. Additionally, the plants exposed to Cd showed visible changes in the leaves pigmentation (chlorosis), which were verified by the *Hansatech* equipment.

It was observed an accumulation of PTEs in the edible part of the plants, which showed higher contamination levels than the ones established by law for horticulture products after 52 days, especially for Cd and As. The concentration of the essential metal Cu only exceeded the limits established by law after 73 days of exposure and this was only observed in samples contaminated by Cu.

Keywords: Basil, *Ocimum basilicum*, cadmium, copper, arsenic, salinity.

EXTENDED ABSTRACT

Plants during all their life cycle are exposed to a wide variety of stress stresses environmental and their origin can be biotic, caused by another organisms, or abiotic, caused by the exposure to different environmental conditions. This occurs due to the disequilibrium between the production and removal of reactive oxygen species (ROS).

The oxidative stress, by inducing the production of ROS, may promote oxidative reactions that will act and damage some of the fundamental constituents, such as lipid peroxidation, proteins oxidation, enzyme inhibitor and damages to DNA and RNA. ROS also affect the metabolic processes like respiration, photosynthesis, CO₂ fixation, etc.

Soil contamination with PTE has been considered to be an important environmental problem since it presents unknown risks for mankind and future generations. These PTE can occur naturally in the soil. However, the majority of these elements are present in the soil due to the anthropogenic activity.

The soil salinity is considered to be one of the most alarming agricultural problems mainly in arid regions, where it limits the agricultural productivity and reduces both crop productivity and quality.

In this project, irrigation experiments were conducted in order to evaluate the basil's response to the stress induced by PTE and NaCl.

In the irrigation experiments, that lasted for 100 days, Cd (50 µM), As (50 µM), Cu (100 µM) and NaCl (25 mM) were applied in order to study the effects of biomass, dry matter content, chlorophyll (*Hansatech*) and mineral composition in basil plants. The application of PTE and NaCl negatively affected the plants biomass. Only the leaves contaminated by Cd showed a considerable decrease in the dry matter content. Regarding the chlorophyll content, it was observed a significant decrease in the plants contaminated by Cd, evidenced by the manifestation of chlorosis in the leaf samples. Thus, its application will affect the photosynthetic system. Nevertheless, this observation was not made in every experiment. In fact, the samples with As and NaCl showed a darker but healthy colouring.

By analysing the mineral composition, the absorbed Cd appears to stimulate the absorption of Ca, Mg, Mn, K and Na and to reducing the absorption of Cu, Fe and Zn. In the experiments with Cu, this element appears to stimulate the absorption of Ca, Mg, Mn, K, Na and Zn and to reduce the absorption of Fe. Regarding the experiments with As, it was observed that this element appears to stimulate the absorption of Fe and Na and to reduce the absorption of Ca, Cu, Mg, Mn, K and Zn. In the experiments with NaCl, this contaminant appears to stimulate the absorption of Fe, K and Zn and to reduce the absorption of Ca, Cu, Mg and Mn. Therefore, it

is confirmed that in the presence of PTE and NaCl, the nutrition value in terms of these elements of basil plants is affected.

The basil plants exposed to NaCl showed visible changes in their growth and development, where they revealed a reduced growth and smaller leaves, with a dark green colouring. It was also verified an accumulation of Cd and As, where after 52 days it exhibited values of concentrations higher than the limits established by law for horticulture products. Regarding Cu and as an essential metal, its concentration only exceeded the limits permitted by law after 73 days of exposure and only for samples contaminated by Cu.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
ABSTRACT	iii
EXTENDED ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE QUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1 Manjerição	2
2.2 Stresse oxidativo	4
2.3 Efeito nos organismos dos elementos potencialmente tóxicos	9
2.4 Metais pesados e a segurança alimentar	10
2.4.1 Cádmio	12
2.4.2 Cobre	13
2.4.3 Arsénio	14
2.7.4 Salinidade por NaCl	15
3. METODOLOGIA	17
3.1 Ensaio de Crescimento em Turfas	17
3.2 Determinações analíticas	19
3.2.1 Determinação do teor de matéria seca	19
3.2.2 Determinação do Teor de Clorofila	20
3.2.3 Determinação do conteúdo mineral	20
3.3 Tratamento estatístico	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Germinação e desenvolvimento das plantas	22
4.2 Efeito dos PTE e do NaCl nas propriedades das plantas	24
4.2.1 Biomassa	24
4.2.2 Teor matéria seca	25
4.2.3 Teor de clorofila - <i>Hansatech</i>	26

4.3 Análise dos elementos minerais nas folhas.....	29
4.3.1 Arsénio	29
4.3.2 Cádmio	31
4.3.3 Cálcio	32
4.3.4 Cobre	34
4.3.5 Ferro	36
4.3.6 Magnésio	37
4.3.7 Manganês	38
4.3.8 Potássio.....	39
4.3.9 Sódio.....	40
4.3.10 Zinco	41
5. CONCLUSÕES	42
5.1 Propostas Futuras.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO I – Ensaio de Crescimento nos dias de Colheitas	XLIX
ANEXO II – Ensaio de crescimento ao longo do tempo de exposição	L

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação do Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>).	3
Figura 2: Equilíbrio na produção e remoção de ROS e acumulação de ROS devido à formação excessiva de ROS e ao sistema antioxidante insuficiente.	6
Figura 3: Respiração Celular.	6
Figura 4: Respostas típicas para micronutrientes (a) e elementos não essenciais (b).	9
Figura 5: Reações de Fenton e Haber-Weiss,	10
Figura 6: Início do Ensaio de Crescimento com Manjeriço; sementeira.	17
Figura 7: Plantas de manjeriço 30 dias após o início do ensaio.	18
Figura 8: Preparação dos garrafões de 5 L com as soluções <i>stock</i> dos contaminantes analisados mais solução nutritiva <i>HOAGLAND</i>	19
Figura 9: Representação do processo de digestão ácida com o caracol de amostras do microondas (CEM MDS 2000).	21
Figura 10: Crescimento de plantas de manjeriço em turfas.	22
Figura 11: Ensaio de Crescimento ao longo dos 97 dias.	23
Figura 12: Variação média da biomassa (g) de plantas Controlo (C) e contaminadas com 100 µM de Cu, 50 µM de Cd, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, durante 77 dias de exposição.	24
Figura 13: Teor de matéria seca (%) em plantas Controlo e contaminadas com 100 µM de Cu, 50 µM de Cd, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, ao longo de 77 dias de exposição.	25
Figura 14: Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias), para o ensaio de plantas controlo e contaminadas com 100 µM de Cu, 50 µM de Cd, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, durante 77 dias de exposição.	27
Figura 15: Ausência de sintomas tóxicos visíveis nas plantas contaminadas por As.	28
Figura 16: Sintomas tóxicos visíveis do Cd na planta de Manjeriço.	28
Figura 17: Ausência de sintomas tóxicos visíveis nas plantas contaminadas por NaCl.	28
Figura 18: Acumulação de As (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjeriço, durante 77 dias de exposição.	29

Figura 19: Acumulação de Cd (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	31
Figura 20: Acumulação de Ca (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	32
Figura 21: Acumulação de Cu (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de contaminação.	34
Figura 22: Acumulação de Fe (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	36
Figura 23: Acumulação de Mg (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	37
Figura 24: Acumulação de Mn (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	38
Figura 25: Acumulação de K (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	39
Figura 26: Acumulação de Na (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	40
Figura 27: Acumulação de Zn (mg kg ⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.	41

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Classificação botânica do manjerição.....	2
Quadro 2: Condições de armazenamento recomendadas para o manjerição.	4
Quadro 3: Concentrações na Solução Nutritiva de <i>HOAGLAND</i>	18

LISTA DE ABREVIATURAS

APX – Ascorbato-peroxidase

ASC – Ascorbato

ATP – Adenosinatrifosfato

CAT – Catalase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAA – Espectrofotometria de absorção atômica

GPX – Glutaciona-peroxidase

GR – Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona

MDA - Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

POD – Guaiacol-peroxidase

PPO – Polifenoloxidase

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

PTE – Elementos potencialmente tóxicos (*Potentially Toxic Elements*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)

RNA – Ácido ribonucleico

SOD – Superóxido-dismutase

1. OBJETIVOS

Ao longo do seu ciclo de vida, as plantas podem ser expostas a uma grande variedade de stresses ambientais, que podem ser bióticos, causados por outros seres vivos, ou abióticos, provenientes de um fator externo que não seja um ser vivo, como por exemplo por elementos potencialmente tóxicos. Os stresses bióticos ou abióticos podem desencadear o desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigénio (ROS), conduzindo a um aumento rápido do nível intracelular destas espécies (Ahmad *et al.*, 2008). Consequentemente um elevado nível intracelular de ROS pode levar à peroxidação de lípidos, oxidação de proteínas, inibição da atividade de algumas enzimas e a danos no DNA e RNA (Möller *et al.*, 2007).

A contaminação das plantas por elementos potencialmente tóxicos cuja principal via de absorção são as raízes, através da solução do solo, resulta da disponibilização destes principalmente por atividades antropogénicas, quer agrícola, industrial ou mineira. Por alguns destes elementos serem tóxicos para o homem quando utilizados na alimentação, torna-se importante estudar a sua acumulação e metabolização nas plantas. Além destes elementos, a elevada salinidade com cloreto de sódio pode reduzir a produtividade das culturas sugerindo um problema não só de saúde humana mas também económico.

Entre o grupo de plantas medicinais e aromáticas de grande valor económico, destaca-se o manjerição, muito utilizado para diversos fins, como ornamental, condimentar, medicinal, aromático, na indústria farmacêutica e de cosméticos e para produção de óleo essencial, sendo esta última utilização a mais valorizada (Pereira & Moreira, 2011). Sendo uma planta de consumo humano torna-se relevante o seu estudo no âmbito da toxicidade e acumulação destes PTE (elementos potencialmente tóxicos) para as plantas.

Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de diversos elementos potencialmente tóxicos, tais como Cd, As, Cu e da salinidade (NaCl), na produtividade do manjerição e a acumulação verificada nas suas folhas, tendo sido avaliados os efeitos visíveis e quantitativos da toxicidade em diversos parâmetros: biomassa, teor de matéria seca, teor de clorofila (*Hansatech*) e composição mineral.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Manjeriço

O Manjeriço pertence à família *Lamiacea*, alternativamente designada por *Labiatae*, compreende entre 180 a 210 géneros e 3500 espécies herbáceas e arbustivas. A região mediterrânica é especialmente rica em espécies de Lamiáceas, que abundam também na flora de diversos *habitats* do território português (Almeida, 2006).

Nas Lamiáceas encontra-se na sua maioria culturas aromáticas e medicinais, com propriedades em larga medida, segundo os seus óleos essenciais. Os óleos essenciais de algumas destas espécies têm grande importância nas indústrias farmacêutica e cosmética (Almeida, 2006).

O manjeriço (*Ocimum basilicum*) é uma das cerca de 150 espécies de plantas herbáceas ou arbustivas anuais do género *Ocimum* (Quadro 1). A sua região de origem estende-se desde o Médio Oriente até ao Irão.

Quadro 1: Classificação botânica do manjeriço.

(Adaptado de Almeida, 2006).

Família	<i>Lamiacea</i>
Subfamília	<i>Nepetoideae</i>
Tribo	<i>Ocimeae</i>
Género	<i>Ocimum</i>
Espécie	<i>Ocimum basilicum</i> L.

Possui um caule ereto, de secção quadrangular, um hábito arbustivo e ramificado que pode atingir 30 a 60 cm de altura (Figura 1). As folhas são ovadas a elípticas. As flores, de corola amareladas ou avermelhadas, encontram-se agrupadas em espigas axilares (Almeida, 2006). Segundo Almeida (2006) a sua capacidade germinativa é cerca de 85%.



Figura 1: Representação do Manjericão (*Ocimum basilicum*).
(*Plantas Medicinales*, 1988).

O manjericão é uma espécie de climas temperados a temperados-quentes, sendo muito sensível à geada. As temperaturas ótimas de crescimento situam-se entre os 15 e 25 °C. Prefere solos francos, ricos em matéria orgânica, mas com boa drenagem (Almeida, 2006) e pH ente 6,0 e 7,5 (Plantar Portugal, 2013). É importante que seja colocado num local ensolarado, onde este possa receber, no mínimo, 6-8 horas de luz por dia.

Pode semear-se entre Janeiro e Março e transplantar-se entre Março e Maio. Quando cultivado em estufa, o manjericão produz normalmente folhas excessivamente grandes, que podem ser preferidas pelo mercado. A cultura ao ar livre só deve ser instalada depois da última geada de Primavera e quando a temperatura média ultrapassar os 12 °C (Almeida, 2006). A germinação das plantas ocorre geralmente entre 5 a 7 dias, após a sementeira (Plantar Portugal, 2013).

O manjericão fresco é um produto muito perecível. As condições ótimas para o seu manuseamento pós-colheita encontram-se resumidas no Quadro 2. Esta planta deve ser irrigada com frequência para que o solo seja mantido levemente húmido, pelo que a falta ou o excesso de água podem prejudicar a cultura (Hortas, 2013).

Quadro 2: Condições de armazenamento recomendadas para o manjeriço.

(Adaptado de Almeida, 2006).

Condições de armazenamento

• Temperatura (°C)	10-12
• Humidade relativa (%)	> 95
Duração prática do armazenamento	8 dias
Atmosfera modificada	
• Potencial para utilização	Elevado
• O ₂ (%)	5-10
• CO ₂ (%)	4-6

O manjeriço difere das outras Lamiáceas por ser sensível a danos provocados pelo frio. Quando as folhas frescas são expostas a temperaturas inferiores a 10 °C desenvolvem zonas necrosadas. É ainda sensível à podridão por fungos, que ao produzirem etileno induzem a abscisão das folhas. Deve ser colhida preferencialmente a partir das 12 horas, devido ao facto de poder afetar a sensibilidade aos danos provocados pelo frio (Almeida, 2006).

2.2 Stresse oxidativo

As plantas, tal como outros seres vivos, ao longo do seu ciclo de vida estão expostas a uma grande variedade de stresses ambientais que podem levar a alterações no seu desenvolvimento. As alterações fisiológicas resultantes da produção intracelular excessiva e/ou acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) definem-se por stresse oxidativo (Vansgroveld *et al.*, 1994). Este fenómeno ocorre devido ao desequilíbrio entre produção e remoção de ROS, isto é, a velocidade de remoção destas espécies é menor que a de produção (Mithofer *et al.*, 2004).

O stresse pode ser biótico, causado por outros seres vivos, ou abiótico, proveniente de um fator externo que não seja um ser vivo (como stresse mecânico, radiação ultravioleta, carência ou excesso de nutrientes, seca, exposição a elementos potencialmente tóxicos, etc.). Este fenómeno provoca um desequilíbrio entre a normal produção de ROS e a atividade de remoção pelos antioxidantes (Ahmad *et al.*, 2008). Para contrariar este desequilíbrio, a planta desencadeia uma resposta metabólica que se manifesta pela ativação de certos mecanismos de eliminação do excesso de ROS no interior das células, de forma a controlar a sua acumulação e permitir a regulação da expressão genética (Mourato *et al.*, 2012).

Em condições normais, a concentração de ROS nas plantas é consideravelmente baixa, mas na presença de metais pesados, outros PTE e certos contaminantes, verifica-se um aumento intracelular de ROS que induz stresse oxidativo (Mittler, 2002; Möller *et al.*, 2007).

As ROS, como é o caso do superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radicais hidroxilo (HO^{\cdot}) e singleto de oxigénio (1O_2), são regularmente produzidos nas células como subprodutos do metabolismo aeróbio das plantas. Estes subprodutos resultam de diferentes vias metabólicas, como a respiração celular, fotorrespiração, oxidação de lípidos e fotossíntese, localizadas em diferentes compartimentos celulares, tais como as mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomas (Navrot *et al.*, 2007; Apel & Hirt, 2004; Möller *et al.*, 2007).

A produção de ROS durante o stresse oxidativo ocorre sobretudo em organelos com elevada atividade de oxidação metabólica ou com o fluxo de eletrões sustentado, como cloroplastos e mitocôndrias. No caso dos cloroplastos, a formação de ROS está associada à fotossíntese. A fotorrespiração nos peroxissomas é outra forma de produzir H_2O_2 (Soares & Machado, 2007).

Em condições fisiológicas normais, a produção de ROS na célula é baixa, com concentrações de $240 \mu M s^{-1} O_2^{\cdot-}$ e um nível de $0,5 \mu M s^{-1} H_2O_2$ nos cloroplastos, enquanto muitos stresses que alteram a homeostase celular elevam a sua produção de ROS para os níveis 240 a $720 \mu M s^{-1} O_2^{\cdot-}$ e 5 a $15 \mu M H_2O_2$. O nível de ROS é utilizado para controlar o nível intracelular de stresse nas plantas, sendo necessário um controlo rígido para evitar morte celular resultante da elevada acumulação de ROS (Mittler, 2002).

Segundo Apel e Hirt (2004), em condições normais existe um equilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação (Figura 2), isto é, as ROS são produzidas em quantidades baixas, sendo posteriormente retidas e/ou acumuladas em certos compartimentos celulares, onde a sua formação e/ou eliminação é rigorosamente controlada.

No entanto, quando as plantas estão sujeitas a condições desfavoráveis, este equilíbrio é alterado, aumentando rapidamente o nível intracelular das ROS (Mittler, 2002).

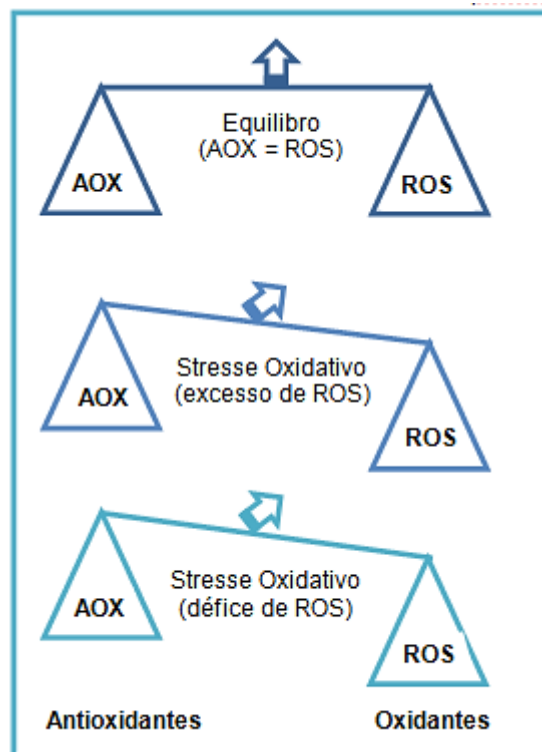


Figura 2: Equilíbrio na produção e remoção de ROS e acumulação de ROS devido à formação excessiva de ROS e ao sistema antioxidante insuficiente.

(Adaptado de Scandalios *et al.*, 2005)

As plantas são seres vivos aeróbios que utilizam o oxigênio (O_2) como aceitador final de elétrons, que depois é reduzido e consequentemente favorece a produção de ROS (Halliwell, 2006).

Durante a respiração celular, a energia é convertida em adenosinatrifosfato (ATP), sendo o aceitador de elétrons o oxigênio (O_2), que é reduzido para produzir água (H_2O), como mostra a Figura 3.

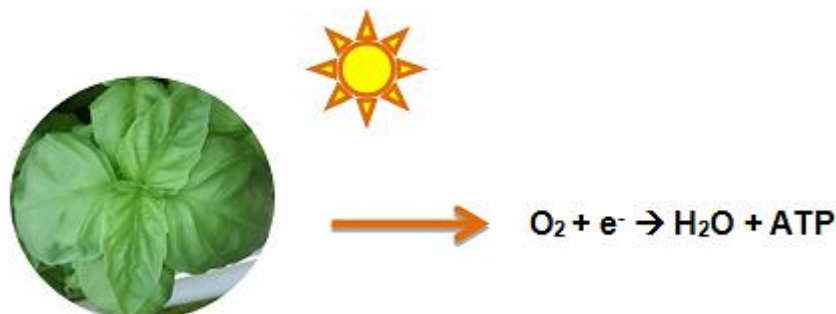


Figura 3: Respiração Celular.

Na mitocôndria, a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP é o resultado do transporte de elétrons através da cadeia transportadora eletrônica, e é durante este processo, que os

eletrões são transferidos por complexos proteicos com potencial redutor crescente, através de reações de oxidação-redução, sendo o último aceitador de eletrões o oxigénio (O_2). Porém, algum oxigénio é reduzido de forma incompleta, particularmente nos complexos I e III, originando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Relativamente aos cloroplastos, a produção do singlete de oxigénio (1O_2) ocorre no fotossistema II (PSII) e do $O_2^{\cdot-}$ no fotossistema I (PSI) e PSII. Quanto aos peroxissomas, estes produzem $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) nas mais variadas reações metabólicas (Möller, *et al.*, 2007).

A atuação das ROS pode trazer consequências negativas, no entanto, esta situação vai depender de vários fatores, tais como quantidade produzida de cada espécie, a reatividade e as moléculas em que atuam, o tempo de semivida, a distância percorrida na célula e o compartimento celular onde são produzidas em grande quantidade.

O H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$ são espécies com pouca reatividade que se produzem em condições metabólicas estáveis. Quanto ao HO^{\cdot} e 1O_2 são espécies muito mais reativas e perigosas e por isso formam-se apenas em condições de stresse. O HO^{\cdot} é um caso particular pois não se conhecem mecanismos específicos que consigam eliminar o seu efeito. A melhor forma para a célula prevenir os danos oxidativos, consiste em controlar os seus precursores, como o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (Möller *et al.*, 2007).

O stresse oxidativo ao induzir a formação das ROS, pode promover reações oxidativas, que por sua vez vão atuar e danificar alguns constituintes essenciais, como a peroxidação dos lípidos, oxidação das proteínas, inibição enzimática e danos no DNA e RNA (Möller *et al.*, 2007). Estas reações no limite podem originar morte celular (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa capazes de combater o stresse oxidativo provocado pelo excesso de ROS. Existem assim, mecanismos antioxidantes enzimáticos e mecanismos não-enzimáticos que protegem as estruturas celulares da planta do stresse oxidativo. Estes mecanismos de eliminação das ROS podem ser encontrados nos cloroplastos, apoplasto, citoplasma, mitocôndrias e peroxissomas das plantas (Gratão *et al.* 2005).

Os mecanismos antioxidantes enzimáticos nas plantas incluem enzimas como a superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPX), ascorbato-peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) (Gratão *et al.*, 2005), polifenoloxidase (PPO) e a guaiacol-peroxidase (GPOD) que participam diretamente na remoção das ROS ou que catalisam reações de formação/regeneração de moléculas para a retenção das ROS (Martins & Mourato, 2008). Quanto ao poder redutor destes mecanismos enzimáticos, estes derivam direta ou indiretamente do NADPH ou da ferredoxina (Möller *et al.* 2007).

O maior sistema antioxidante nas plantas envolve a ação das enzimas SOD, APX e CAT, sendo estas cruciais para a diminuição do impacto do stresse oxidativo nas células (Apel & Hirt, 2004).

A superóxido-dismutase (SOD) atua como a primeira linha de defesa contra as ROS, eliminando o superóxido com a formação de peróxido de hidrogénio em grande parte dos compartimentos celulares, no entanto, este peróxido de hidrogénio vai ser eliminado pelas enzimas APX, GPX e CAT de forma a evitar o seu efeito nocivo (Apel & Hirt, 2004).

Segundo Mittler (2002), estima-se que a APX possa ser responsável pela modelação rigorosa de ROS para sinalização e a CAT ligada à remoção do excesso de ROS produzidas durante o stresse. A CAT é a única enzima que degrada H_2O_2 sem impor o fornecimento de redutores equivalentes para a sua função, o que confere à célula um mecanismo eficiente de remoção deste substrato (Scandalios, 2005; Gechev *et al.*, 2006).

O ciclo glutathiona-ascorbato na generalidade dos compartimentos celulares e a grande afinidade da APX para o peróxido de hidrogénio, propõe que esta via execute um papel fundamental no controlo do nível de ROS nesses mesmos compartimentos.

Os antioxidantes não enzimáticos são por vezes necessários para a atividade de algumas enzimas, como por exemplo o ascorbato (ASC), substrato da APX e a glutathiona (GSH) substrato da GPX. O ascorbato e a glutathiona, que se encontram em elevadas concentrações nos cloroplastos e noutros compartimentos celulares (5-20 mM de ascorbato e 1-5 mM de glutathiona), são determinantes para a defesa da planta contra o stresse oxidativo (Mittler, 2002).

O ASC reage com os radicais HO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ e 1O_2 . Sendo um antioxidante principal, e possivelmente o único tampão antioxidante no apoplasto é também um metabolito essencial envolvido com as funções vitais da célula (Gratão *et al.*, 2005). Relativamente à GSH, esta é um dos principais tampões redox na maioria das células aeróbicas, desempenhando um papel importante em funções fisiológicas, tais como, regulação redox, conjugação dos metabolitos, homeostase e sinalização celular que desencadeiam respostas adaptativas. A GSH no sistema de defesa antioxidante indica as suas utilizações como marcador de stresse (Gratão *et al.*, 2005).

Outros antioxidantes não enzimáticos conhecidos são compostos pertencentes ao grupo dos carotenoides, tocoferóis, compostos fenólicos, aminoácidos não proteicos, flavonóides e alcalóides (Apel & Hirt, 2004).

2.3 Efeito nos organismos dos elementos potencialmente tóxicos

Os metais pesados fazem parte de um grupo de elementos vestigiais que se encontram presentes em baixas quantidades nos solos, plantas e águas (Prasad, 2004) e apresentam uma densidade superior a $5,0 \text{ g cm}^{-3}$ (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

A definição de metal pesado é muito variável, baseando-se em vários parâmetros, tais como a massa atômica, a densidade dos elementos, a toxicidade e o número atômico (Duffus, 2002). Contudo muitos autores denominam por metal pesado qualquer metal ou semi-metal que seja caracterizado por ser potencialmente tóxico para o ambiente ou organismos vivos, por este motivo ao longo do trabalho denominam-se os nossos contaminantes como PTE's (Dalcorso *et al.*, 2013).

Metais, como o Cu e o Zn, são considerados micronutrientes essenciais para o desenvolvimento normal da planta, no entanto, o seu efeito tóxico faz-se sentir em concentrações elevadas (Figura 4). Como estes metais essenciais são facilmente absorvidos pelas plantas, a sua presença em quantidades superiores ao normal é comum (Hall, 2002). Metais não essenciais, como é o caso do cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), são designados poluentes do solo, por se encontrarem em quantidades superiores ao normal ou distantes do seu local habitual. Isto pode trazer consequências graves para os organismos mesmo em concentrações baixas (Varennnes, 2003).

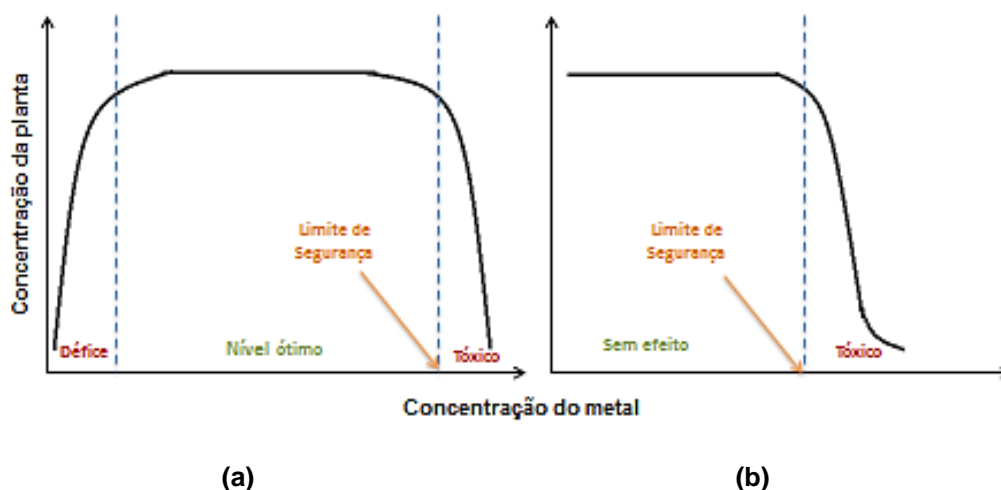


Figura 4: Respostas típicas para micronutrientes (a) e elementos não essenciais (b).

(Adaptado de Alloway & Ayres, 1993).

Os metais pesados que existem naturalmente nas rochas apresentam menores riscos para os seres vivos e a sua ocorrência natural em solos depende, principalmente, do material de origem e dos seus processos de formação. No entanto, a grande maioria dos metais pesados

aparece nos solos por contaminação resultante da atividade antropogénica (agrícola, industrial e mineira) (Martins & Mourato, 2008).

Quando as plantas são expostas a certos iões metálicos, há uma alteração no seu metabolismo normal, levando a um aumento significativo e acumulação de H_2O_2 . Este H_2O_2 pode ser posteriormente convertido em radicais livres (HO^\bullet) na presença de metais de transição redox, como Cu^+ e o Fe^{2+} , por uma reação catalisada pelo metal, via reações de Fenton. Quanto aos iões metálicos oxidados, estes podem passar novamente a uma forma reduzida a partir de uma reação subsequente com os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Contudo, existem outras reações designadas por reações de Haber-Weiss que, independentemente da presença do metal, também formam radicais HO^\bullet diretamente a partir de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, como mostra a Figura 5 (Mithofer *et al.*, 2004).

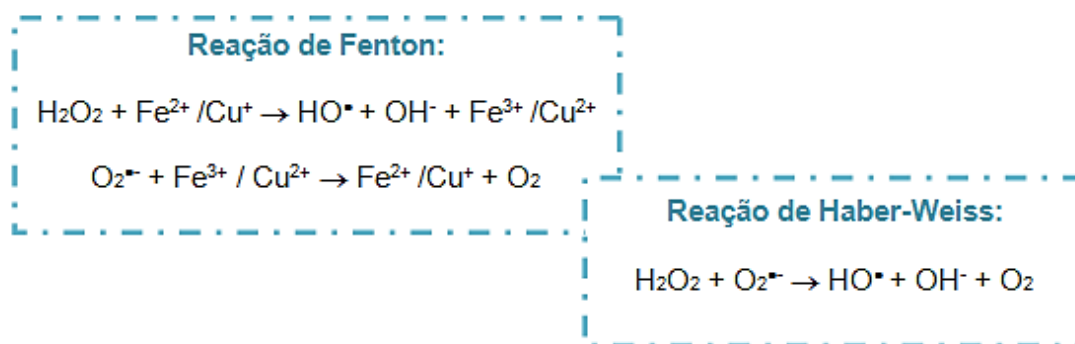


Figura 5: Reações de Fenton e Haber-Weiss,
(Adaptado de Mithother *et al.*, 2004)

2.4 Metais pesados e a segurança alimentar

A presença de metais pesados no ambiente é um tema de grande relevância, visto que a sua bioacumulação na cadeia alimentar pode proporcionar distúrbios metabólicos nos seres vivos e no Homem. Deste modo, a contaminação dos solos com estes elementos tem sido reconhecida como um importante problema ambiental, podendo ocasionar riscos ainda desconhecidos para o Homem e gerações futuras (Mattias, 2006).

Sendo os alimentos um veículo de entrada destes elementos potencialmente tóxicos no organismo humano, torna-se importante para as indústrias alimentares e ambiental compreender mais sobre estes processos de acumulação e toxicidade, com o objetivo de minimizar e/ou controlar os possíveis danos ao consumidor. Os PTE nos alimentos constituem um dos obstáculos para o ramo alimentar, na medida em que o organismo humano não tem capacidade para os eliminar e estes tendem a acumular-se em alguns órgãos do corpo humano podendo ter consequências a longo prazo (Baptista & Venâncio, 2003).

A acumulação de elementos tóxicos nas plantas e consequentemente ao longo da cadeia alimentar depende da biodisponibilidade do elemento tóxico. De acordo com Varennes (2003) a biodisponibilidade corresponde à fração disponível desse elemento ou substância presente numa forma capaz de ser absorvida por um organismo, admitindo uma determinada via específica de exposição. Nas plantas, cuja principal via de absorção dos metais é através da solução do solo, a biodisponibilidade está dependente das formas em que esses metais se encontram no ambiente (Pinto, 2011), podem estar na forma solúvel, encontrarem-se em formas precipitadas, adsorvidas (como argila e matéria orgânica) ou existentes na matriz dos minerais do solo (Reichman, 2002).

As diferentes frações de um metal no solo encontram-se em equilíbrio dinâmico, sendo a sua proporção relativa sujeita às características do meio, como o pH, força iónica, teor de matéria orgânica e de argila, capacidade de troca catiónica, potencial redox, flora microbiana, textura, entre outros (Martins & Mourato, 2008).

Existem plantas que conseguem desenvolver mecanismos específicos para regular a biodisponibilidade dos metais, restringindo a absorção do metal a partir do solo. No entanto outras, conforme os níveis intracelulares encontrados, conseguem acumular elevadas quantidades de um metal específico que para diversos organismos é tóxico mesmo em quantidades muito inferiores, sendo designadas por plantas acumuladoras ou hiperacumuladoras (Clemens *et al.*, 2002).

De acordo com Varennes (2003), a toxicidade de um metal pesado depende da sua biodisponibilidade, isto é, da presença de formas suscetíveis de serem utilizadas pelas plantas ou pelos organismos do solo. Um elemento pode ser fitotóxico para algumas plantas mas não apresentar toxicidade considerável para o Homem e vice-versa, acumulando-se na planta e entrando na cadeia alimentar dos seres vivos (Silva, 2006).

O princípio de atuação da fitorremediação surgiu como uma técnica importante na acumulação de metais, que utiliza as plantas e os micróbios a elas associados para a recuperação de zonas poluídas/contaminadas (Carvalho, 2007). As plantas mais indicadas para esta técnica devem apresentar várias características, como rápido crescimento, elevada biomassa, raízes profundas, de fácil colheita e deve tolerar e acumular uma gama de metais pesados na sua parte aérea (Clemens *et al.*, 2002).

2.4.1 Cádmio

O cádmio é um metal pesado não-essencial com longa persistência biológica, manifestando alta toxicidade para plantas, animais e seres humanos (Mishra *et al.*, 2006). As atividades industriais e antropogênicas são responsáveis pelas elevadas emissões de cádmio no meio ambiente até concentrações que excedem significativamente as suas fontes naturais (Nriagu, 1988).

Ao contrário de outros metais tóxicos, o cádmio presente no solo é facilmente absorvido pelas raízes das plantas, especialmente em solos ácidos (Guimarães *et al.*, 2008). Apesar de ser relativamente móvel no solo, na forma de íon Cd^{2+} , compete com os íons de Ca^{2+} e K^+ à superfície de coloides de argila e coloides orgânicos. Sendo assim, a disponibilidade de certos nutrientes bem como os valores do pH, influenciam na biodisponibilidade e consequentemente na absorção de Cd (Gomes, 1998; Clemens *et al.*, 2002).

Apesar de ser tóxico mesmo em pequenas quantidades para animais e para o Homem, as plantas toleram níveis mais elevados deste metal (Mengel & Kirkby, 2001). Na maioria das plantas o cádmio acumula-se mais nas raízes do que nas folhas, sendo a baixa acumulação de Cd nas folhas uma estratégia para proteger a função fotossintética do stresse oxidativo induzido pelo cádmio (Milner & Kochian, 2008; Markovska *et al.*, 2009).

A acumulação de Cd interfere na assimilação, transporte e utilização de diversos elementos como Ca, Mg, P e K, bem como de água (di Toppi & Gabbrielli, 1999). A absorção de íons Cd parece estar em competição para o mesmo transportador transmembranar com nutrientes, tais como K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn (Benavides *et al.*, 2005).

O Cd quando é absorvido pelas plantas tem um efeito inibitório na fotossíntese originando a degradação da clorofila, diminuição do metabolismo de carbono e alterações no metabolismo do ferro, pelo que alguns dos sintomas de fitotoxicidade de Cd são o aparecimento de cloroses e necroses nas folhas, seguidas pela abscisão foliar. Outros autores demonstraram ainda que a absorção de Cd pelas plantas pode levar à inibição do seu crescimento ou mesmo causar a senescência, no entanto, os mecanismos envolvidos são ainda pouco compreendidos (Sandalio *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007).

De acordo com o *Codex Alimentarius* o limite semanal para a ingestão de cádmio recomendado é $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal. A dose letal média (DL_{50}) de Cd para o Homem é de $0,027 \text{ g kg}^{-1}$ de peso vivo (Mendes & Oliveira, 2004).

Segundo o Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001, o teor máximo de cádmio nos produtos hortícolas de folha é de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.

2.4.2 Cobre

O cobre (Cu) é um micronutriente e um componente essencial para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, pelo que a sua ausência pode causar o desenvolvimento de sintomas de deficiência mais específicos, os quais afetam as folhas jovens e órgãos reprodutivos. Nas células, existe sob a forma Cobre (I) (Cu^+) e Cobre (II) (Cu^{2+}) interagindo com uma grande variedade de processos bioquímicos e fisiológicos (Yruela, 2009).

A quantidade do ião cobre (Cu^{2+}) em solução é muito baixa e diminui com o aumento do pH. Sendo assim, formam-se compostos insolúveis em solos alcalinos, como é o caso do hidróxido de cobre e hidroxicarbonato de cobre e aumenta a adsorção aos colóides. Relativamente à concentração de quelatos de cobre, esta é pouco afetada pela reação do solo, pelo que as plantas absorvem Cu principalmente a partir de quelatos de cobre (II) (Varennnes, 2003). A toxicidade do Cu é por isso mais acentuada em solos ácidos, pois há uma maior disponibilidade do elemento devido às condições existentes.

O cobre pode ocorrer naturalmente nos solos ou ter origem em atividades antropogénicas, como a acumulação de fertilizantes, aplicação de fungicidas, explorações mineiras, atividades industriais e urbanas (Moreira, 2011). A concentração de Cu nos solos varia frequentemente entre 1 e 60 mg Cu kg^{-1} de solo, sendo muito superior em solos que estejam contaminados com o metal (Lamas, 2012).

Nas plantas as concentrações normais de Cu variam entre 5 a 20 mg Cu kg^{-1} de matéria seca (Varennnes, 2003). No entanto em níveis elevados torna-se bastante fitotóxico para as células que causam a inibição do crescimento das plantas ou até mesmo a morte (Upadhyay & Panda, 2009).

Quando este elemento se encontra em excesso pode afetar as espécies de diferentes formas e também causar diversos efeitos, conforme o estado de desenvolvimento da planta no qual o metal foi aplicado, a concentração de Cu e a duração da ação. Têm sido feitas referências quanto ao excesso de Cu em plantas, indicando que este fato pode influenciar alguns parâmetros, tais como o crescimento, conteúdo mineral e teor de clorofila, e muitas atividades enzimáticas (Martins & Mourato, 2006). Na presença de elevadas concentrações de Cu ocorre deficiência de Fe, dado que o Cu o substitui em diversas proteínas (Varennnes, 2003).

2.4.3 Arsénio

O arsénio (As) é o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre e encontra-se distribuído por vários ecossistemas (Rezanka & Sigler, 2008). Este elemento é um metaloide, muitas vezes, considerado por vários autores como um metal pesado devido à sua toxicidade sobre o ambiente e os seres vivos (Miteva, 2002). As fundições, os combustíveis fósseis e alguns pesticidas, constituem as principais causas de contaminação dos solos com As, sendo este elemento ainda hoje utilizado na indústria de semicondutores, em pigmentos e na indústria do vidro (Varennnes, 2003).

A concentração de As no solo varia entre 5 e 100 mg As kg⁻¹, no entanto podem ser encontrados níveis mais elevados nas vizinhanças de minas ou de fundições (Varennnes, 2003).

O solo contaminado com As constitui uma das principais fontes deste elemento na água potável, sendo a sua ingestão uma das formas mais comuns de envenenamento (Alkorta *et al.*, 2004). De forma a garantir a proteção da vida humana e produção agrícola, tem sido utilizada a técnica de fitorremediação para limpar locais poluídos com As, incluindo águas subterrâneas, pois é um método que está a ganhar atenção devido às preocupações ambientais e aos custos de remediação associados com os processos de remediação convencionais (Singh & Ma, 2006).

Na natureza, este elemento apresenta vários números de oxidação e os mais comuns são o (III) e o (V), no entanto o As (III) é a forma mais disponível para as plantas. Os microrganismos do solo atuam sobre o As alterando o número de oxidação ou metilando-o. Certas formas reduzidas ou metiladas são voláteis, perdem-se no solo, permanecendo aí arsenatos e arsenitos (Varennnes, 2003).

Quando a concentração de arsénio disponível no solo é elevada, a maioria das espécies é afetada pela sua toxicidade ao nível do metabolismo vegetal. O elemento atua negativamente sobre o normal crescimento e desenvolvimento das plantas (Rahman *et al.*, 2007), que pode ir desde a inibição do crescimento das raízes até à morte da planta (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Segundo Mendes & Oliveira (2004), a dose letal média de As é de 0,07 g kg⁻¹, sendo todos os compostos de As tóxicos para o Homem.

Quanto ao Regulamento (CE) N.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Fevereiro de 2005, relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais de origem vegetal ou animal, o limite máximo de arsenito de sódio nos produtos alimentares é de 0,01 mg kg⁻¹ de peso fresco.

2.7.4 Salinidade por NaCl

Salinidade é um termo que qualifica uma situação de excesso de sais solúveis no solo ou no ambiente radicular onde as plantas se desenvolvem. Este termo constitui um dos fatores de maior preocupação na agricultura moderna, sendo os sais originados a partir da desintegração dos minerais encontrados nos solos e nas rochas. Estes são transportados pelas águas e armazenados nos solos acumulando-se à medida que a água é evaporada ou consumida pelas culturas, iniciando o processo de salinização. No entanto, a irrigação inadequada constitui o principal responsável pelo aumento da quantidade de solos degradados por esta via (Oliveira *et al.*, 2010), e na maior parte das áreas de produção, o uso de água de baixa qualidade para irrigação bem como a aplicação de concentrações excessivas de fertilizantes são os principais motivos para o aumento da salinidade do solo. Em regiões áridas e semiáridas, constitui um sério problema, limitando a produção agrícola e reduzindo a produtividade das culturas (Gheyi *et al.*, 2010).

Espécies de iões, como Sódio (Na^+), Cloreto (Cl^-), Hidrogenocarbonato (bicarbonato) (HCO_3^-), Fosfato (PO_4^{3-}), Cálcio (Ca^{2+}), Magnésio (Mg^{2+}), Sulfato (SO_4^{2-}) e Borato (BO_3^{3-}), estão muitas vezes presentes em quantidades que afetam o crescimento das culturas, pelo que em condições áridas os sais acumulam-se na camada superior do solo através de evapotranspiração, que por sua vez provoca um aumento na água subterrânea que contém sais. Este processo pode ocorrer por irrigação principalmente se a água for rica em sais, sendo o efeito especialmente marcado onde a água subterrânea está próxima da superfície, como acontece nas depressões ou nos locais de baixa altitude e quando a água de irrigação entra em contacto com a água subterrânea (Mengel & Kirkby, 2001).

As respostas ao stresse salino variam bastante consoante o genótipo da planta, enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade, outras são altamente suscetíveis. As plantas podem ser classificadas como halófitas, aquelas que crescem naturalmente em ambientes com elevadas concentrações salinas (cerca de 300 kmol m^{-3} a $600 \text{ kmol m}^{-3} \text{ NaCl}$) e as glicófitas, que envolvem a maioria das espécies de culturas e cuja tolerância ao sal é relativamente baixa (Willadino & Camara, 2010; Mengel & Kirkby, 2001). A maioria das plantas cultivadas, entretanto, são glicófitas. Estas apresentam um desequilíbrio de iões K^+/Na^+ no tecido da planta, sendo muitas vezes acompanhada com um grande excesso de Na^+ . A aptidão das plantas para manter a homeostase de K^+ e as baixas concentrações de Na^+ no citoplasma parece ser uma determinante importante da tolerância da planta ao sal (Mengel & Kirkby, 2001).

A acumulação de sal nos solos constitui um fator negativo no crescimento e desenvolvimento das culturas mais sensíveis e em diversos processos metabólicos, tais como assimilação de CO_2 , síntese proteica, respiração e muitas vezes promove a síntese de solutos compatíveis. No crescimento, a presença de sais solúveis no meio pode atingir as plantas de diferentes formas, ou seja, podem sofrer de stresse hídrico, pois um solo salino normalmente

contém uma quantidade abundante de água, mas de água de baixa disponibilidade; desequilíbrios iônicos intracelulares (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) que podem ser causados por uma grande concentração de sal; concentrações elevadas de íons específicos podem ser tóxicas e provocar desordens fisiológicas (Na^+ , Cl^-) (Mengel & Kirkby, 2001).

Nas plantas os efeitos da salinidade provocam perdas de produtividade e de qualidade, ou perda total de produção. As que crescem em ambientes salinos são muitas vezes atrofiadas com pequenas folhas amorfas verde azuladas e o crescimento da parte aérea é geralmente mais reduzido do que o crescimento da raiz. Relativamente ao crescimento e desenvolvimento de folhas jovens, estas são beneficiadas sobre folhas maduras, as quais podem acumular grandes concentrações de íons tóxicos levando à morte prematura a fim de garantir o desenvolvimento das folhas jovens (Mengel & Kirkby, 2001).

As necessidades de NaCl para adultos compreende cerca de 1 a 3 g dia^{-1} de NaCl e regra geral concentrações superiores não são perigosas dada a eficiência dos rins para eliminar este elemento (Mendes & Oliveira, 2004).

3. METODOLOGIA

Ao longo deste trabalho foi realizado um ensaio de crescimento com plantas de Manjerição (*Ocimum basilicum* L.), que permitiu estudar algumas alterações fisiológicas e morfológicas resultantes da exposição a diferentes PTE (elementos potencialmente tóxicos).

Neste ensaio foram avaliados os efeitos causados pelos seguintes PTEs: Cádmio (aplicado na forma de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com a concentração de $50 \mu\text{M}$), Arsénio (aplicado na forma de $\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ com a concentração de $50 \mu\text{M}$) e Cobre (aplicado na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ com a concentração de $100 \mu\text{M}$), bem como os efeitos causados pela Salinidade provocada por cloreto de sódio (NaCl para a concentração de 25 mM). Os efeitos destes contaminantes sobre a planta foram avaliados durante um longo período de exposição (77 dias), num ensaio que decorreu em 97 dias. Este tempo foi definido tendo em conta o período necessário para a comercialização desta planta para consumo alimentar, que é cerca de 90 dias (Hortas, 2014).

Os ensaios das plantas de Manjerição decorreram nas instalações do Horto de Química Agrícola, da Unidade de Investigação de Química Ambiental (UIQA), do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

3.1 Ensaio de Crescimento em Turfas

O ensaio de crescimento ocorreu na parte exterior da estufa do Horto que apresenta um sistema de manutenção de temperatura por abertura automática através de sensor, além de permitir uma iluminação natural das plantas, com a finalidade de manter as condições ótimas de crescimento.

Em 10 tabuleiros de $50 \times 30 \text{ cm}$, colocaram-se 30 cilindros de substrato previamente humedecidos com água desionizada a cerca de 50°C , e adicionadas 5 sementes a cada um. Os tabuleiros foram colocados na estufa exterior e os cilindros de substrato foram mantidos húmidos com água desionizada, de modo a fornecer um meio adequado à germinação das sementes, como se pode visualizar através da Figura 6.



Figura 6: Início do Ensaio de Crescimento com Manjerição; sementeira.

Após 20 dias com rega de água desionizada, desde o início do ensaio, a 19 de Fevereiro, iniciou-se a rega com solução nutritiva (Figura 7).

Dos 10 tabuleiros utilizados 2 foram regados com solução nutritiva de HOGLAND (Quadro 3) e os restantes com solução nutritiva contaminada com cada um dos PTE. Dois tabuleiros com 50 μM de Cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), dois com 50 μM de Arsénio ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dois com 100 μM de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e dois com 25 mM de NaCl (Cloreto de Sódio).



Figura 7: Plantas de manjericao 30 dias após o início do ensaio.

Quadro 3: Concentrações na Solução Nutritiva de *HOAGLAND*.

Solução nutritiva de <i>HOAGLAND</i>	Reagentes	Concentração
Solução stock de Macronutrientes	Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	6 mM
	Nitrato de Potássio (KNO_3)	6 mM
	Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,5 mM
	Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4)	1 mM
Solução stock de Micronutrientes	Ácido Bórico (H_3BO_3)	100 μM
	Sulfato de Manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	100 μM
	Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	30 μM
	Molibdato de Sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 μM
	Cloreto de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 μM
	Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,1 μM
Solução stock de Fe-EDTA	—	75 μM

A preparação da solução nutritiva de *HOAGLAND* contaminada, controlo e NaCl para rega encontra-se ilustrado na Figura 8. Para cada um dos contaminantes em estudo foram adicionadas as quantidades necessárias à solução de *Hoagland* de forma a obter as concentrações finais pretendidas, 50 μM Cd, 50 μM As, 100 μM Cu e 25 mM NaCl.

0 μM Controlo	50 μM Cd	50 μM As	100 μM Cu	25 mM NaCl
—	0,05 M de Cloreto de Cádmio	0,05 M de Arsenato de Sódio	0,1 M de Sulfato de Cobre	7,3050 g de Cloreto de Sódio.

+ Solução Nutritiva *HOAGLAND*



Figura 8: Preparação dos garraões de 5 L com as soluções *stock* dos contaminantes analisados mais solução nutritiva *HOAGLAND*.

As colheitas de material vegetal foram realizadas com pelo menos 15 dias de diferença entre elas. A primeira teve lugar ao fim de 52 dias pós sementeira, a segunda decorreu no dia 73, a terceira e quarta colheita foram nos dias 87 e 97 respetivamente. A evolução ao longo do ensaio está presente nas figuras em anexo I e II.

Em cada colheita foi medido o teor de clorofila diretamente e colhidas pelo menos 10 plantas. As plantas foram separadas do substrato e foi determinada a sua massa individualmente. As folhas foram cortadas dos caules e enxaguadas com água desionizada, seguida de seca por centrifugação.

3.2 Determinações analíticas

Para estudar o efeito dos PTE (Cd, As, Cu) e Salinidade na planta de Manjerição foram realizadas várias determinações analíticas, estudou-se a biomassa, o teor de massa seca, clorofila através do *Hansatech* e o conteúdo mineral.

3.2.1 Determinação do teor de matéria seca

No processo de colheita, após a pesagem das plantas, as folhas foram cortadas, lavadas e posteriormente pesadas em fresco e secas a 80 °C durante 7 dias. Posteriormente, foram novamente pesadas, maceradas e armazenadas em local seco para posterior determinação da composição mineral. Com o valor de massa das folhas fresca e seca é possível determinar o teor de massa seca utilizando:

$$\% \text{ Matéria Seca} = \frac{\text{Matéria Seca}}{\text{Matéria Fresca}} \times 100$$

3.2.2 Determinação do Teor de Clorofila

Em cada dia de colheita foi efetuada a determinação do teor de clorofila utilizando o aparelho *Hansatech*, o qual se baseia num método não destrutivo e adimensional. O teor foi medido em 10 folhas de cada modalidade de estudo, ou seja em cada PTE, NaCl e controlo e em cada folha registou-se o valor em 3 zonas distintas.

3.2.3 Determinação do conteúdo mineral

Na determinação do conteúdo mineral foi utilizado o material seco proveniente das folhas e substrato. As amostras foram maceradas até ficarem em pó, sendo posteriormente pesadas 0,5 g de amostra em tubos de *teflon*.

A cada tubo adicionou-se 5 mL de ácido nítrico (HNO_3) sendo posteriormente fechados e colocados no micro-ondas (CEM MDS 2000) para proceder ao início da digestão, onde as amostras foram sujeitas a elevadas pressões e temperaturas, de modo a que a matéria orgânica seja digerida. Nesta digestão ocorre libertação de dióxido de carbono e vapor de água. Após concluir a digestão, os tubos foram levados para a *hotte* onde transferiu-se o conteúdo para balões de 25 mL, acertando o volume final com água desionizada.

Os minerais em estudo foram o Cd, As, Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca. O Cd foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica em câmara de grafite, enquanto os restantes elementos determinaram-se por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) à chama. Na figura seguinte é possível visualizar o interior do micro-ondas onde as amostras foram digeridas.

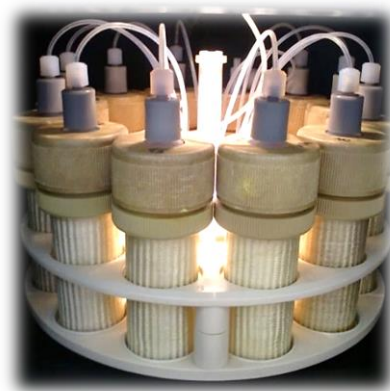


Figura 9: Representação do processo de digestão ácida com o carrocél de amostras do micro-ondas (CEM MDS 2000).

3.3 Tratamento estatístico

No tratamento dos resultados utilizou-se o programa estatístico “*SPSS Statistics 17.0*”, com a análise de variância a um fator (ANOVA), de modo a avaliar o efeito das diferentes concentrações de metais nas plantas de manjerição. A comparação das médias foi possível através do teste de *Tukey*, a um nível de confiança de 95%.

As letras minúsculas e símbolo (*) foram utilizados para salientar as diferenças significativas presentes nos valores das médias.

No ensaio realizado as letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia.

Relativamente às barras de erro das colunas nos gráficos, estas dizem respeito ao desvio-padrão em relação à média das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação e desenvolvimento das plantas

As sementes de manjerição iniciaram a germinação ao dia 8 pós sementeira (Figura 10) e desenvolveram-se em substrato rico em nutrientes até ao dia 97, após a colheita.

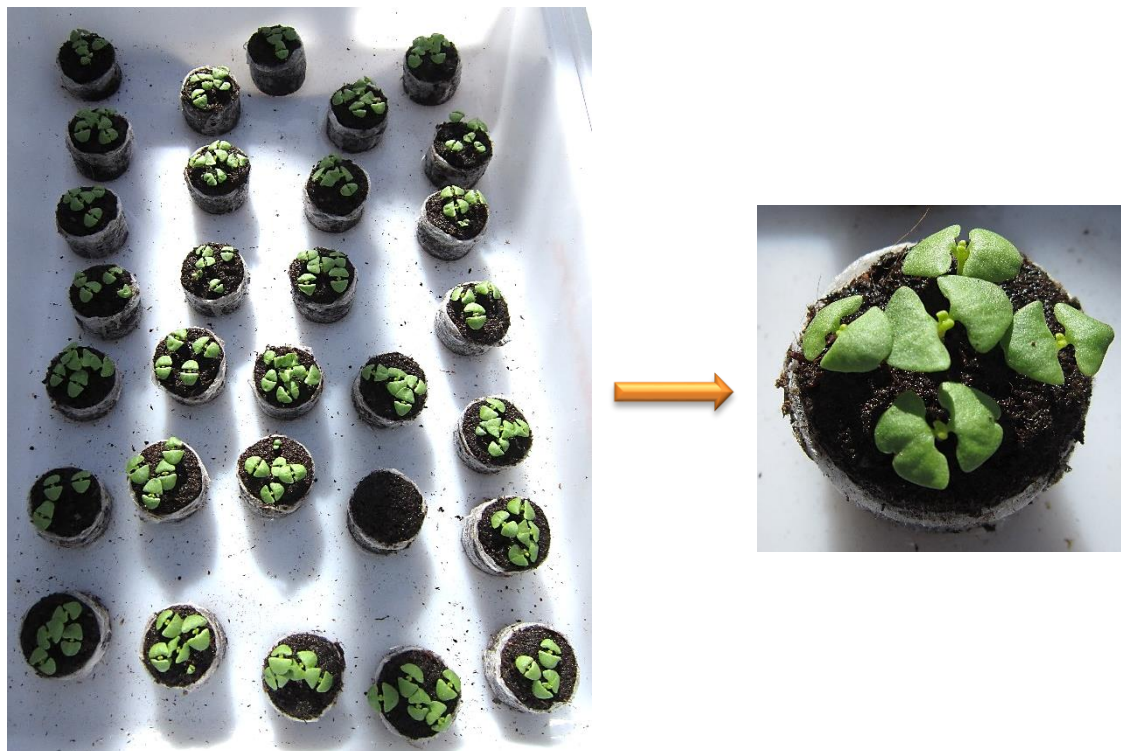


Figura 10: Crescimento de plantas de manjerição em turfas.

As amostras dividiram-se em controlo e contaminadas com Cádmio, Cobre, Arsénio e Salinidade (NaCl), no qual foi feito o registo fotográfico das mesmas como se visualiza na Figura 11.

No geral, ao longo do ensaio verificou-se um crescimento normal das plantas, à exceção do ensaio com salinidade (NaCl) e arsénio. No entanto, as plantas de manjerição na presença de salinidade foram as apresentaram mudanças mais visíveis no crescimento e desenvolvimento, exibindo uma menor estatura e folhas mais pequenas. Relativamente ao teor de clorofila, houve uma tendência para a sua diminuição (cloroses), principalmente para as amostras contaminadas com Cádmio e Cobre.

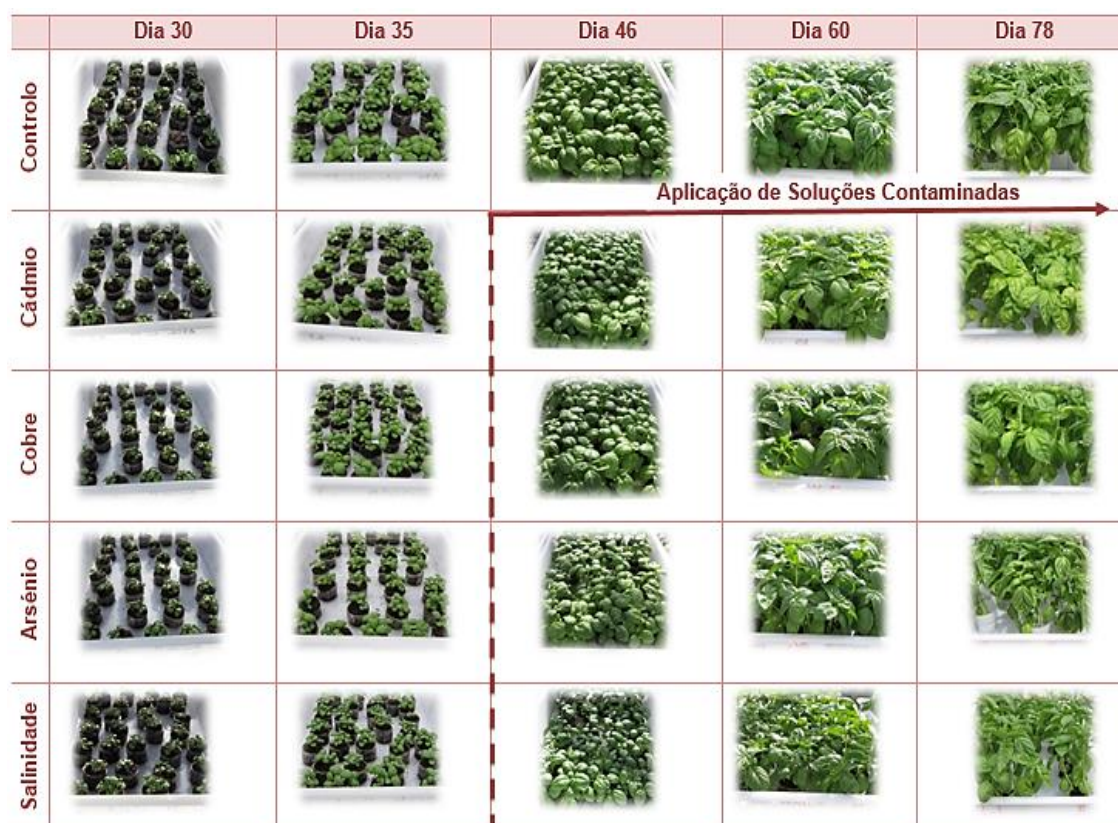


Figura 11: Ensaio de Crescimento ao longo dos 97 dias.

4.2 Efeito dos PTE e do NaCl nas propriedades das plantas

Para este ensaio nas plantas, os parâmetros em estudo foram a biomassa, o teor de matéria seca e a de clorofila.

4.2.1 Biomassa

A Figura 12 representa a variação média da biomassa de plantas de manjeriço sem contaminação (C) e sujeitas a contaminação com Cu, Cd, As e NaCl durante 77 dias.

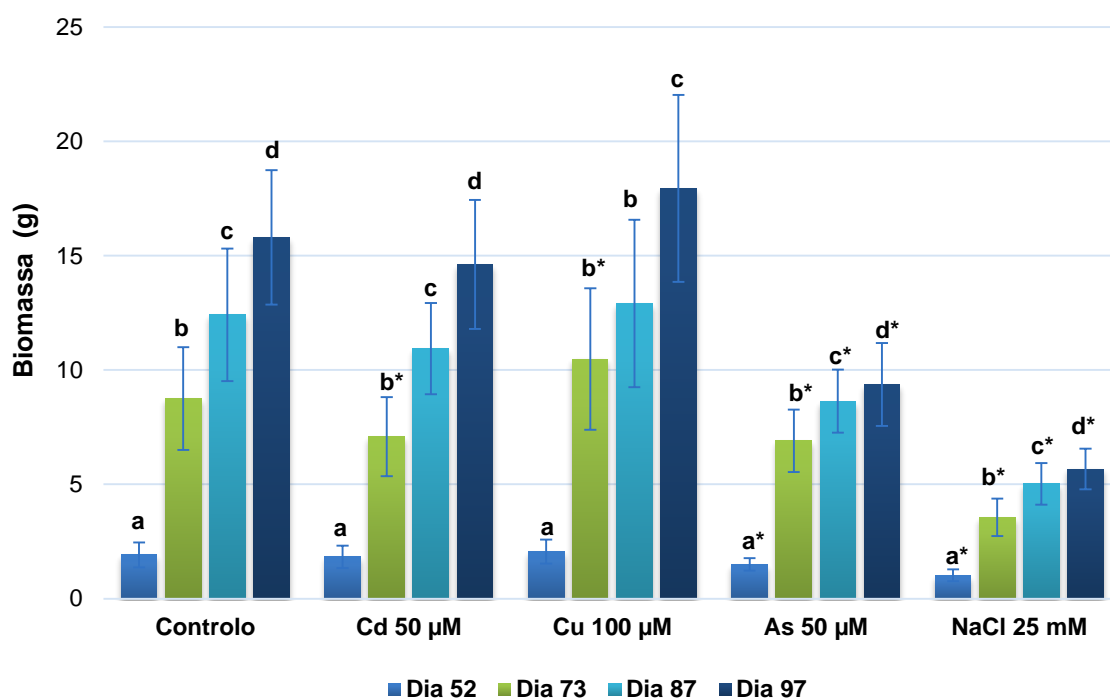


Figura 12: Variação média da biomassa (g) de plantas Controlo (C) e contaminadas com 100 µM de Cu, 50 µM de Cd, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=10$.

Na Figura 12 observa-se que ao longo do tempo houve um aumento na produção de biomassa para todas as concentrações de contaminantes, registando-se também diferenças significativas entre as contaminações em estudo e o controlo. Em todas as modalidades (C, Cd, Cu, As e NaCl), entre os dias 52 e 73 verificou-se a maior diferença nos valores da biomassa, pois o período de duração da contaminação foi mais prolongado. No caso do Cu e do Cd é possível verificar que existem poucas diferenças significativas em relação ao controlo, em termos da biomassa produzida.

No caso do ensaio com NaCl, as plantas apresentaram um menor crescimento em comparação com as modalidades C, Cd e Cu, o que nos leva a crer que a salinidade interfere na produtividade da planta, ou seja, a absorção de sais pode exceder o nível de tolerância do material vegetal. Quando comparamos com as amostras de controlo ao longo de todo o período de exposição, verificam-se diferenças significativas confirmando a hipótese que a salinidade afeta a biomassa.

Relativamente ao ensaio com As, a quantidade de biomassa também demonstrou ser significativamente inferior à obtida no controlo, durante todo o tempo de exposição. O mesmo acontece para a contaminação com Cd mas apenas no dia 73. No entanto, no restante período de ensaio as plantas contaminadas com Cd tiveram um comportamento semelhante ao das amostras de controlo.

4.2.2 Teor matéria seca

Na Figura 13 é apresentada a variação do teor de matéria seca para o ensaio sem contaminação (C) e com contaminações por Cu, Cd, As e NaCl.

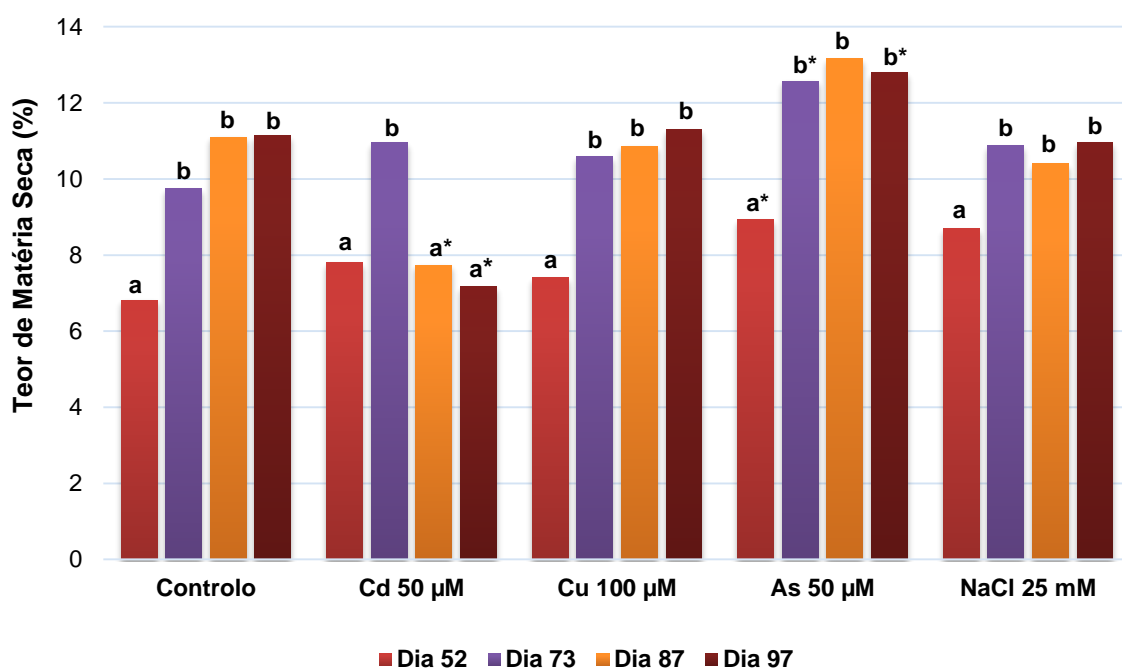


Figura 13: Teor de matéria seca (%) em plantas Controlo e contaminadas com 100 µM de Cu, 50 µM de Cd, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, ao longo de 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=10$.

Analisando o gráfico (Figura 13) verificam-se, ao longo do tempo, diferenças significativas dentro de cada uma das contaminações e uma tendência para o aumento da quantidade de matéria seca (%), exceto para a contaminação com Cd a partir do dia 87.

No ensaio com o contaminante Cd, a partir do dia 87 a percentagem de matéria seca foi significativamente inferior ao das amostras de controlo, pelo que a exposição a este PTE não teve influência no parâmetro a partir deste período.

Quanto ao ensaio com As, todos os tempos de colheita mostraram ter uma percentagem de matéria seca significativamente superior à obtida nas amostras de controlo e também é com este contaminante que são obtidos maiores valores de matéria seca, para os tempos de exposição mais longos. Isto parece indicar que o As causa uma maior restrição à absorção de água pelas plantas em comparação às amostras de controlo.

Relativamente aos contaminantes Cu e NaCl, verificam-se que ambos apresentam valores no teor de matéria seca comparativamente semelhantes aos obtidos pelas amostras de controlo, não havendo grandes variações ao longo do ensaio.

4.2.3 Teor de clorofila - *Hansatech*

No gráfico seguinte (Figura 14) estão representadas as variações adimensionais do teor de clorofila, medido com o aparelho *Hansatech* no ensaio de plantas controlo e contaminadas com Cu, Cd, As e NaCl.

Analisando o gráfico do ensaio com As, verifica-se que de todas as modalidades estudadas, o contaminante As é o que apresenta maior concentração de clorofila, sendo este parâmetro nos dias 52, 73 e 97 significativamente superior ao obtido nas amostras de controlo. Isto mostra que a sua adição influenciou positivamente o teor de clorofila, facto que é confirmado pela ausência de sintomas visíveis do efeito tóxico do As nas plantas, como cloroses (Figura 15).

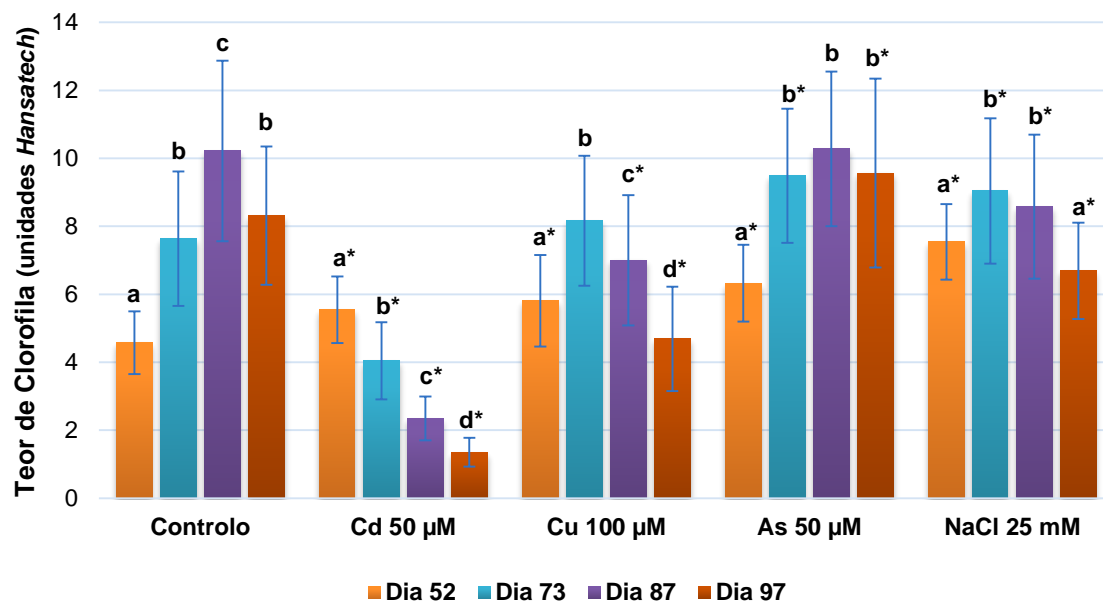


Figura 14: Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias), para o ensaio de plantas controlo e contaminadas com 100 µM de Cu, 50 µM de Cd, 50 µM de As e 25 mM de NaCl, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=10$.

No gráfico é possível observar que para o ensaio com Cd, o teor de clorofila vai diminuindo ao longo do tempo, demonstrando existir diferenças significativas entre todos os tempos de colheita, em relação ao controlo. Além disso, verifica-se que a partir do dia 73 há um decréscimo significativo do teor de clorofila quando comparado com as do controlo, pelo que a exposição ao Cd afetou negativamente este parâmetro. Os menores valores obtidos no teor de clorofila são comprovados pelos sintomas visíveis do efeito tóxico do Cd nas plantas (cloroses), como é observável pela Figura 16.

Relativamente ao ensaio com NaCl, o teor de clorofila também apresenta valores significativamente superiores aos das amostras de controlo tornando as folhas ligeiramente mais escuras. Este efeito pode ser explicado pela menor área foliar que as plantas apresentam, pelo que a mesma quantidade de clorofila se encontra concentrada numa área foliar menor. Isto pode-se verificar através da Figura 17, tal como nos Anexos I e II permitem visualizar estas diferenças ao longo do tempo. No entanto, observa-se uma diminuição significativa da concentração de clorofila, analogamente ao controlo, a partir do dia 87. Esta situação também é observável para todos os outros contaminantes à exceção do Cd, podendo este facto ser normal do crescimento das plantas ou dever-se a algum fator externo não controlado.

Observando a modalidade Cu, apenas o dia 52 mostra ter um teor de clorofila significativamente superior ao do controle, situação que se inverteu a partir do dia 87. Ou seja, a partir do terceiro tempo de colheita (dia 87), a concentração de clorofila foi afetada pela adição de Cu na solução nutritiva.



Figura 16: Ausência de sintomas tóxicos visíveis nas plantas contaminadas por As.



Figura 17: Sintomas tóxicos visíveis do Cd na planta de Manjeriço.



Figura 15: Ausência de sintomas tóxicos visíveis nas plantas contaminadas por NaCl.

4.3 Análise dos elementos minerais nas folhas

Além dos contaminantes das modalidades (Cu, Cd, As e NaCl) estudadas neste ensaio, foram também analisados outros elementos minerais presentes nas plantas de manjeriço, nomeadamente, cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe), potássio (K), cobre (Cu), sódio (Na), cádmio (Cd) e arsénio (As). A avaliação dos restantes minerais na planta destina-se a verificar qual a influência que a presença de cada contaminante pode exercer na absorção dos restantes minerais, de que forma se manifesta uma interação entre eles e como podem influenciar a acumulação na planta.

As concentrações dos elementos acima mencionados estão apresentadas nos gráficos seguintes (Figura 18 à 27). Em todos eles foi analisada a influência dos PTE e NaCl na composição em minerais da planta.

4.3.1 Arsénio

O gráfico da Figura 18 mostra o teor mineral nas plantas em análise para o caso em que houve aplicação do elemento Arsénio.

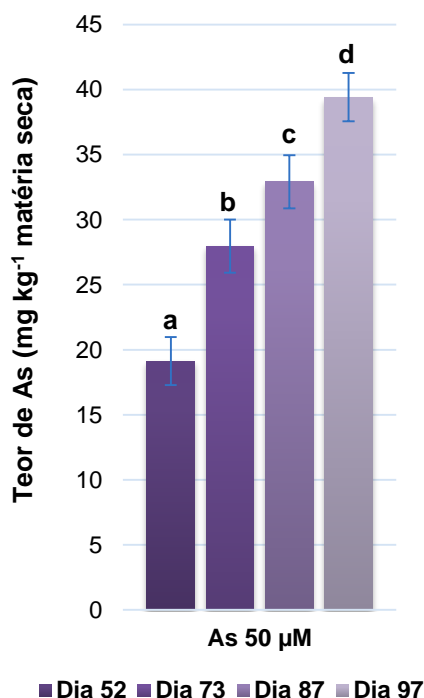


Figura 18: Acumulação de As (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjeriço, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl, para um dado dia; $n=3$.

A presença de As foi detetada apenas nas plantas contaminadas com este elemento, verificando-se que a concentração deste mineral nas plantas aumentou ao longo do tempo de exposição, indicando que a planta absorve este elemento e o acumula na sua parte aérea, constituindo um risco para os consumidores. Nas restantes modalidades analisadas em que este elemento não foi aplicado e nas plantas controlo (C), o teor de As encontra-se em concentrações abaixo do limite de deteção, tal como se esperava.

4.3.2 Cádmio

O gráfico da Figura 19 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Cádmio.

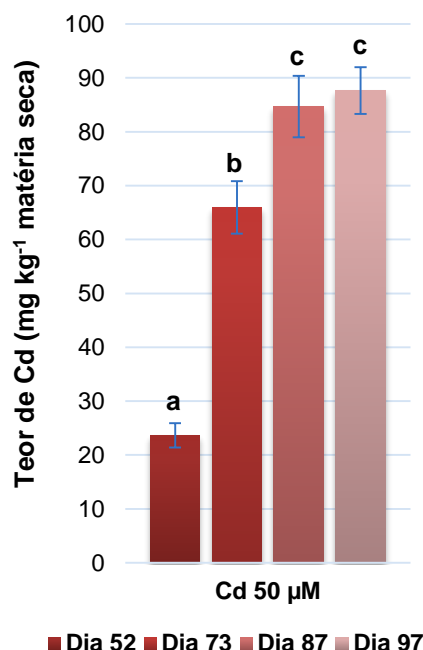


Figura 19: Acumulação de Cd (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl, para um dado dia; $n=3$.

O gráfico da Figura 19 apenas representa o teor de Cd nas plantas contaminadas com este elemento, porque a sua presença não foi detetada a sua presença nas restantes contaminações estudadas, em que não houve aplicação de Cd. Isto significa que o teor de Cd encontra-se em concentrações abaixo do limite de deteção tal como se esperava, visto não ter sido adicionado às soluções nutritivas utilizadas neste ensaio. Relativamente às amostras contaminadas com Cd, verificou-se que a concentração deste mineral aumentou ao longo do tempo de exposição.

4.3.3 Cálcio

O gráfico da Figura 20 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Cálcio.

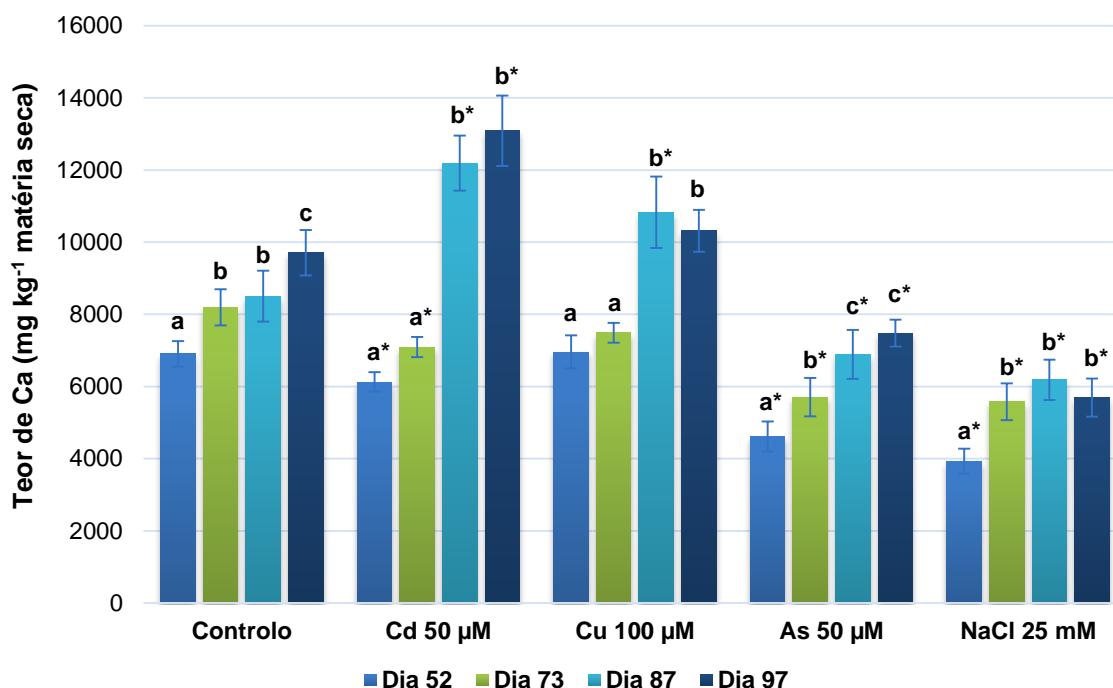


Figura 20: Acumulação de Ca (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Pela análise do gráfico da Figura 20 verifica-se que houve uma tendência para o aumento do teor de Ca ao longo do tempo de exposição, correspondendo ao período de desenvolvimento da planta.

A concentração de Ca em plantas contaminadas com Cd nos dias 87 e 97 e Cu no dia 87 foi significativamente superior à obtida pelas amostras de controlo nos mesmos tempos de colheita. Sendo o Cd um metal pesado com alta toxicidade para plantas e outros seres vivos (Mishra *et al.*, 2006), em situações de stresse induzido por este elemento, um aumento da concentração de Ca constitui um possível mecanismo para reduzir os efeitos tóxicos de Cd (Wang *et al.*, 1992). Isto pode estar relacionado com o facto de haver semelhanças entre estes dois elementos na forma iónica, ambos catiões divalentes, que por sua vez competem entre si na absorção pela planta.

No entanto, também é possível detetar teores de Ca significativamente inferiores em comparação com as amostras de controlo, nomeadamente, Cd nos dias 52 e 73 pelas mesmas razões anteriormente mencionadas, As e NaCl a partir do dia 52, sugerindo a hipótese de

interferência destes elementos no transporte de Ca para a parte aérea. De acordo com Mengel & Kirkby (2001), uma elevada concentração de sal pode provocar desequilíbrios iônicos intracelulares (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}).

Estes resultados sugerem diferentes tipos de interação dos contaminantes com a absorção do Ca: Cd e Cu não parecem restringir a absorção de Ca, podendo mesmo favorece-la, enquanto que As e NaCl parecem atuar pela restrição da absorção da solução do solo, reduzindo assim a absorção do Ca. Estes resultados estão concordantes com o aumento dos valores de matéria seca obtidos na presença de As, indicando restrição da absorção da solução do solo, assim como a diminuição da biomassa verificada para estes dois contaminantes.

4.3.4 Cobre

O gráfico da Figura 21 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Cobre.

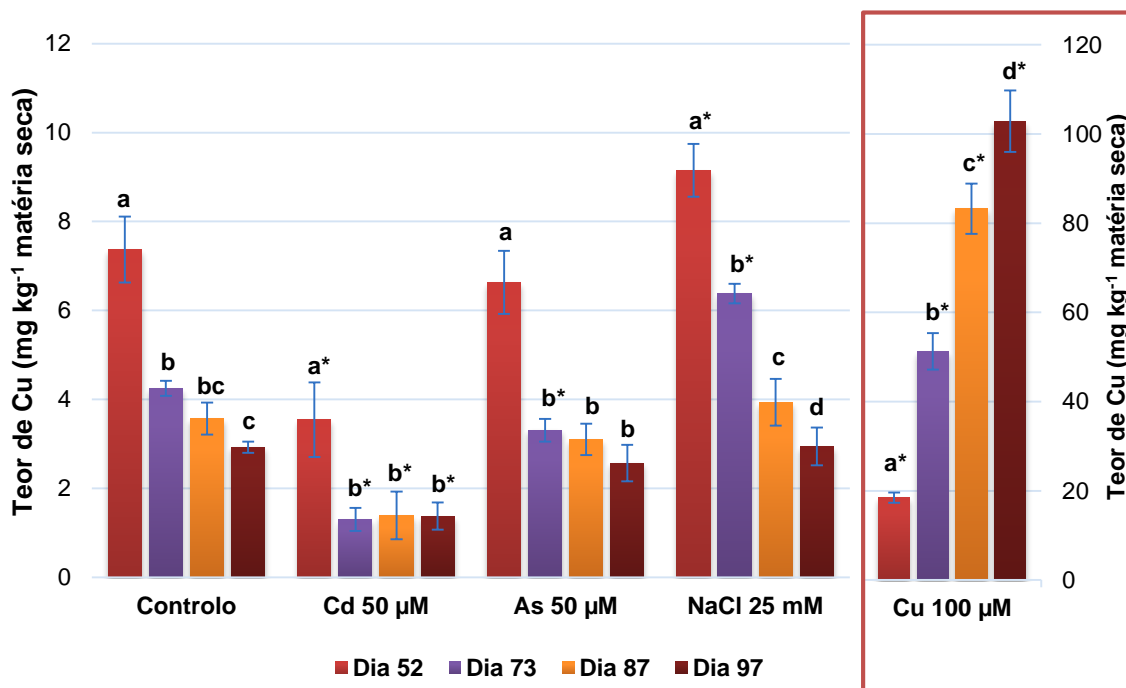


Figura 21: Acumulação de Cu (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de contaminação.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Apenas no caso do ensaio em que foi aplicado o Cu os valores deste elemento na planta aumentaram. Este contaminante apresentou maior teor de Cu durante todo o tempo de ensaio, facto que já era previsto uma vez que se analisou o teor do mineral Cu nas amostras contaminadas com este elemento.

Observa-se uma tendência para os valores de Cu diminuírem ao longo do tempo para todas as modalidades estudadas (C, Cd, As e NaCl), mesmo no caso do controlo. Em comparação com as amostras de controlo, o contaminante Cd foi o único que para todos os tempos de colheita apresentou um teor de Cu significativamente inferior, o que já não se verifica de forma semelhante para as restantes contaminações. Comparando com o controlo, também é possível verificar a existência de valores significativamente elevados para o ensaio com NaCl nos dias 52 e 73.

Observando o ensaio em que foi efetuada contaminação com Cd, constatou-se que este foi o único que apresentou concentrações de Cu significativamente inferiores às obtidas nas amostras de controlo a partir do dia 52. Segundo Benavides *et al.* (2005), a absorção de iões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador transmembranar com nutrientes, tais como K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn e Ni. Isto pode explicar o facto de haver uma diminuição significativa do teor de Cu na presença de Cd.

4.3.5 Ferro

O gráfico da Figura 22 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Ferro.

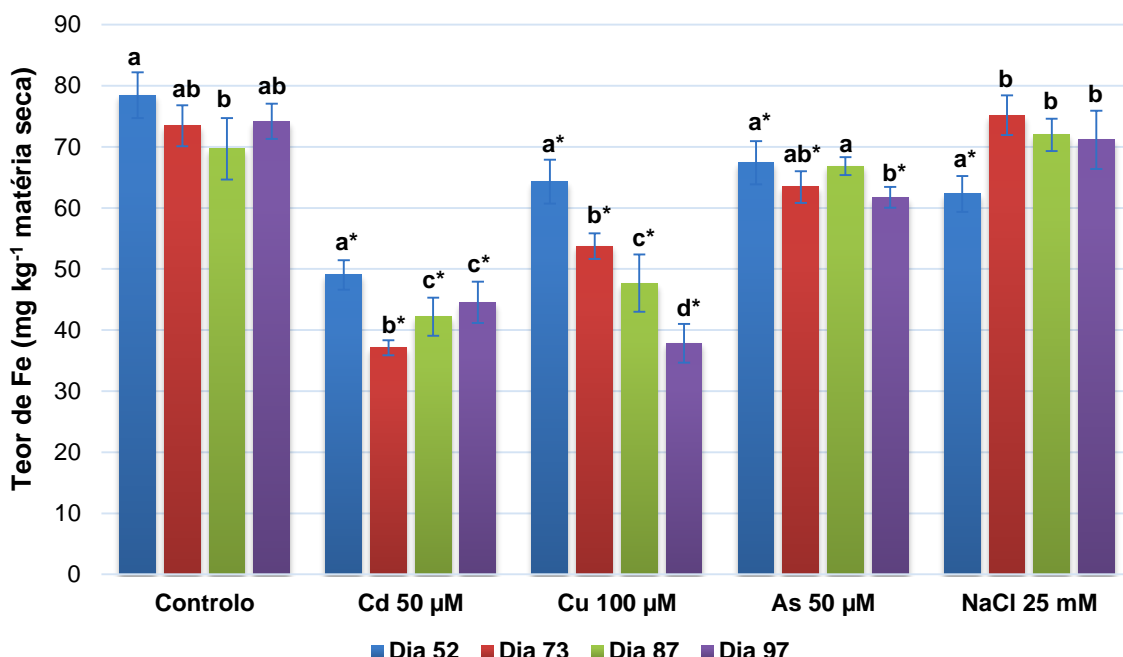


Figura 22: Acumulação de Fe (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjericão, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Analisando o gráfico correspondente ao teor de Fe (Figura 22), observa-se que a aplicação de As na solução nutritiva no dia 87 e NaCl a partir do dia 73, não afetou de forma significativa a concentração deste mineral nas folhas, facto que é comprovado pela semelhança de valores do teor de Fe em relação aos das amostras de controlo.

Quanto à contaminação com Cd, é possível verificar que no geral é de todas as contaminações a que apresenta menor concentração de Fe ao longo do tempo, pelo que, segundo Clemens (2006), o sistema de absorção do ferro está regulado de maneira a permitir a entrada de cádmio através da sua via de transporte. É por esta razão que na presença de Cd o teor de Fe é relativamente mais baixo. Este resultado pode explicar o facto de se ter observado cloroses, que normalmente advém da carência em Fe.

O cobre demonstrou afetar negativamente a absorção de ferro ao longo do tempo com significância, resultado que pode ser explicado de acordo com Varennes (2003), ou seja, na presença de elevadas concentrações de Cu ocorre deficiência de Fe, dado que o Cu o substitui em diversas proteínas.

4.3.6 Magnésio

O gráfico da Figura 23 mostra o teor mineral nas plantas para o elemento Magnésio.

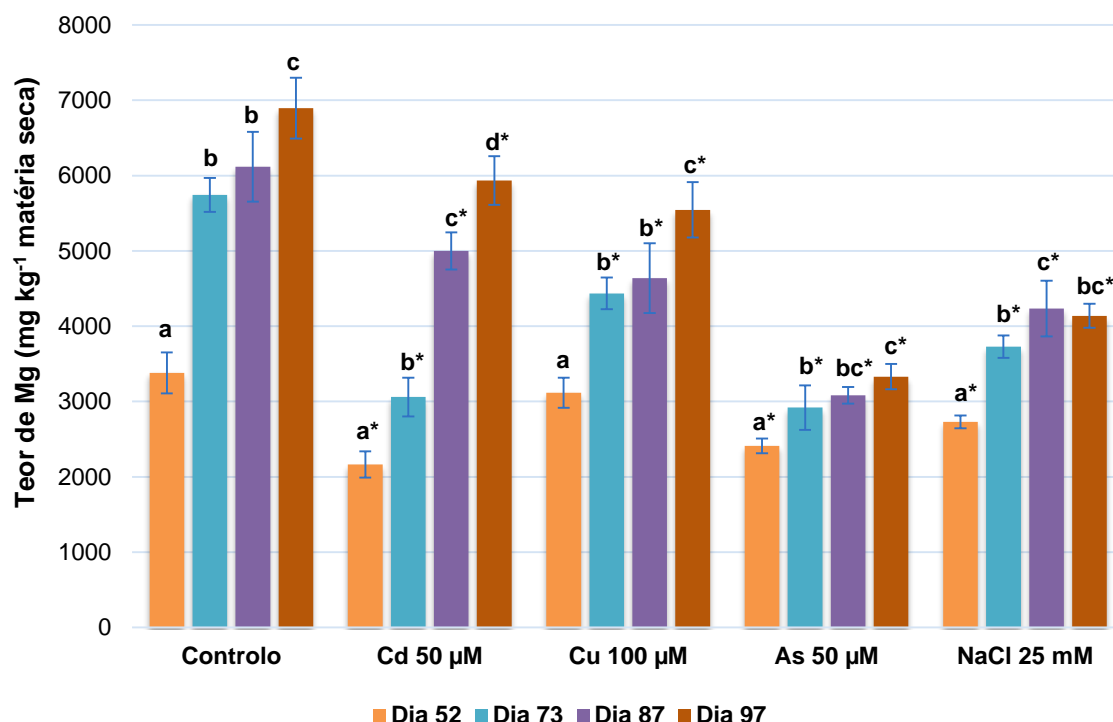


Figura 23: Acumulação de Mg (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjeriço, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Na Figura 23 é possível observar que apenas a adição de Cu no dia 52 mostrou um teor de Mg sem diferença estatística ao existente nas amostras de controlo, o que já não aconteceu para os outros tempos de colheita do ensaio com Cu e restantes contaminações (Cd, As e NaCl), ou seja, o teor de Mg foi significativamente inferior ao obtido nas amostras de controlo, sugerindo a hipótese de que a acumulação destes elementos interferiu na assimilação, transporte e utilização de Mg pelas plantas.

No ensaio com Cd e Cu observam-se valores nos teores de Mg significativamente inferiores aos das amostras de controlo, à exceção do dia 52 para Cu. Ou seja, o decréscimo nos teores de Cu não significa a inibição da sua absorção na totalidade, mas apenas uma diminuição comparativamente aos ensaios de controlo.

4.3.7 Manganês

O gráfico da Figura 24 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Manganês.

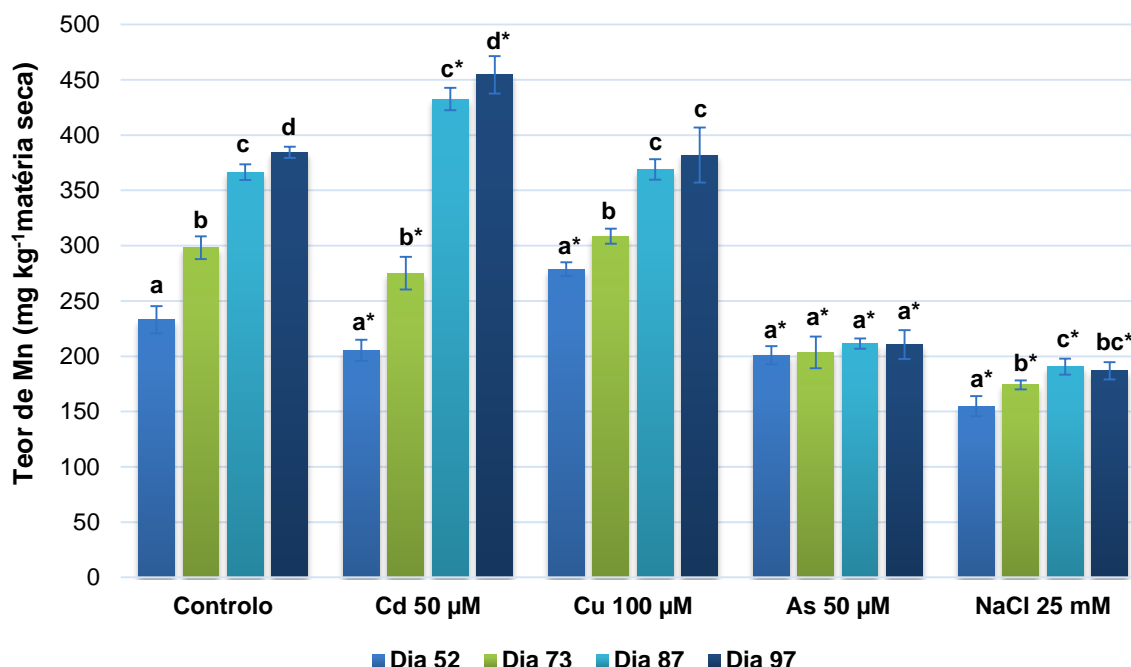


Figura 24: Acumulação de Mn (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjeriço, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

No gráfico da Figura 24 verifica-se um aumento do teor de Mn ao longo do tempo para os contaminantes Cd e Cu, o que já não acontece para As e NaCl.

A adição de Cd a partir do dia 87 e Cu no dia 52 provocou um aumento significativo do teor de Mn face às amostras de controlo. Como já foi dito anteriormente, a absorção de iões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador com o nutriente Mn, no entanto, de acordo com os resultados obtidos na presença de Cd, a entrada de Mn pela raiz da planta não foi negativamente afetada principalmente para os dias referidos (87 e 97).

Contudo, as amostras contaminadas com Cd nos dias 52 e 73 e As e NaCl para todos os tempos de colheita (dias 52, 73, 87 e 97), apresentam uma redução significativa do teor de Mn comparativamente às amostras controlo, pelo que a adição destes elementos afetou negativamente a absorção de Mn. Tal como referido no parágrafo acima, o contaminante Cd ao competir com o mineral Mn impede a sua entrada na raiz da planta, por essa razão é que observou-se um teor de Mn significativamente inferior.

4.3.8 Potássio

O gráfico da Figura 25 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Potássio.

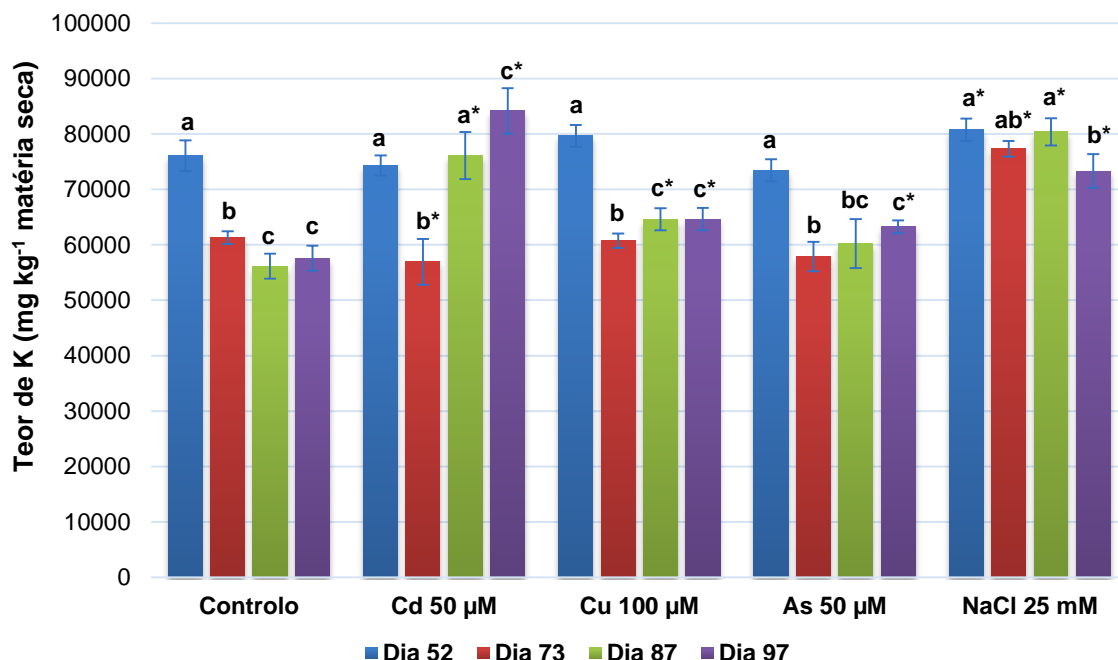


Figura 25: Acumulação de K (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Observando o gráfico da Figura 25 é possível comprovar que a adição de Cu a partir do dia 87, As no dia 97 e NaCl em todos os tempos de colheita levou a um aumento significativo do teor de K nas folhas, comparativamente com as amostras de controlo. Isto significa que para estas contaminações nos tempos referidos houve uma influência positiva na absorção de K pelas plantas. O mesmo já não acontece para as amostras contaminadas com Cd no dia 73, que apresentaram um teor de K significativamente inferior ao ensaio de controlo.

4.3.9 Sódio

O gráfico da Figura 26 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Sódio.

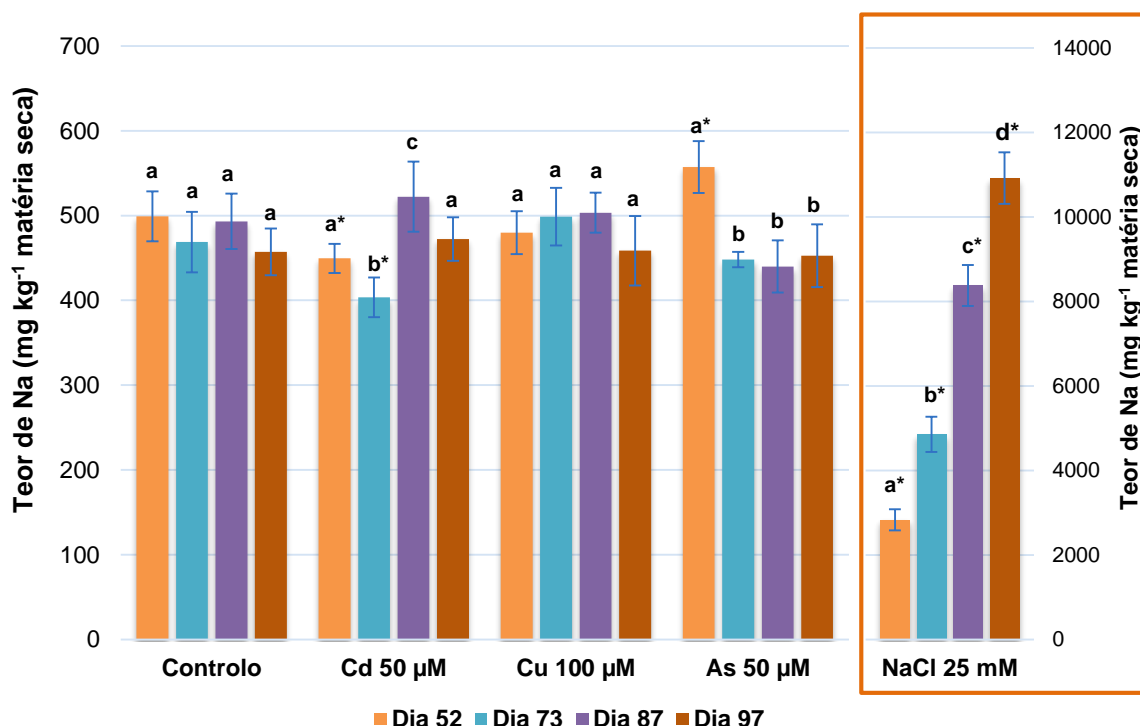


Figura 26: Acumulação de Na (mg kg⁻¹ matéria seca) em folhas de plantas de manjerição, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Quanto ao teor de Na nas folhas, como se pode visualizar pelo gráfico da Figura 26, verificou-se que entre as modalidades (C, Cd, Cu, As e NaCl) estudadas, a de NaCl foi a que apresentou maior teor de Na ao longo do tempo de exposição, facto que já era previsto, pois analisou-se o teor do mineral Na nas amostras contaminadas com NaCl. Sendo assim, em comparação com as amostras de controlo, o teor de Na foi significativamente superior nas plantas contaminadas com NaCl. Além disso, também é possível verificar a existência de valores significativamente elevados para o ensaio com As no dia 52, relativamente ao controlo.

Observando o ensaio com Cd, constatou-se que este foi o único que apresentou valores no teor de Na nos dias 52 e 73 significativamente inferiores aos obtidos nas amostras de controlo. Isto mostra que nestes tempos de colheita, a contaminação com Cd afetou negativamente a absorção de Na pela planta.

4.3.10 Zinco

O gráfico da Figura 27 mostra o teor mineral nas plantas, em análise para o elemento Zinco.

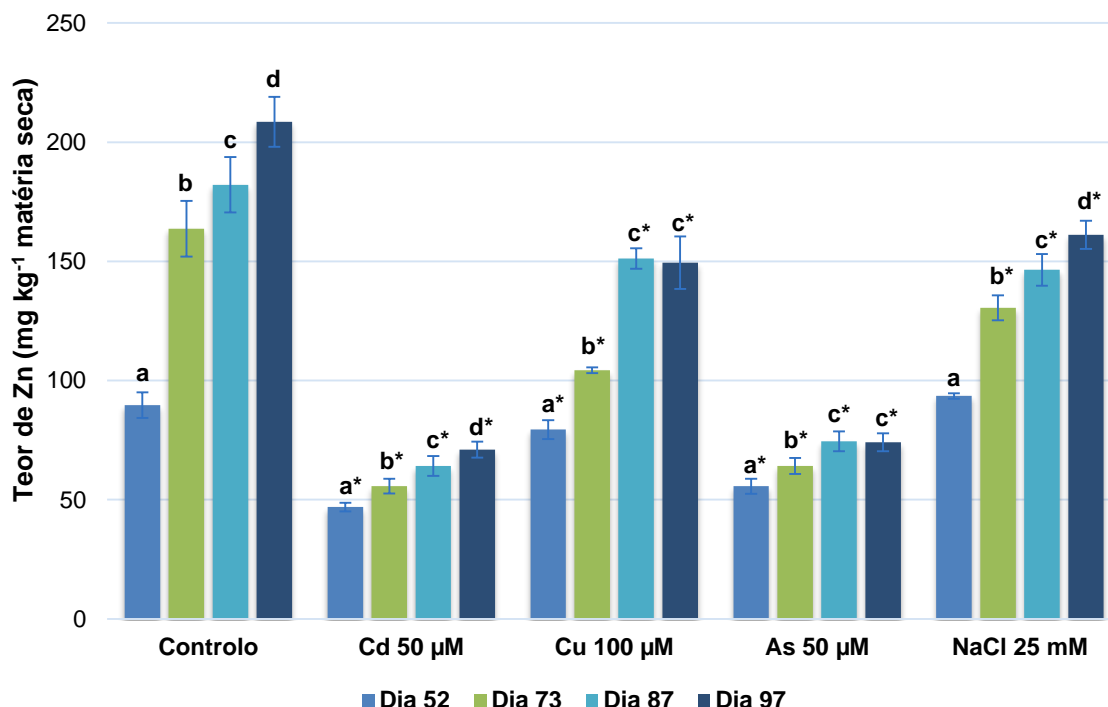


Figura 27: Acumulação de Zn (mg kg^{-1} matéria seca) em folhas de plantas de manjeriço, durante 77 dias de exposição.

Legenda: As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e o símbolo (*) à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o Controlo e as diversas concentrações PTE ou NaCl para um dado dia; $n=3$.

Pela Figura 27 é possível observar uma tendência para o aumento de Zn ao longo do tempo.

As amostras contaminadas com NaCl no dia 52 foram as únicas que apresentaram valores semelhantes do teor de Zn aos obtidos no ensaio de controlo. Quanto aos outros tempos de colheita para NaCl bem como as restantes modalidades analisadas (Cd, Cu e As), verificou-se uma redução significativa do teor de Zn nas folhas relativamente às amostras de controlo. Dado este acontecimento, pode-se afirmar a existência de uma aparente competição na absorção de Zn pela planta em relação aos contaminantes em estudo, ou então que o transporte de Zn para a parte aérea está a ser afetado. Apesar de a absorção de Zn ser um pouco limitada para todos os contaminantes, verificam-se diferenças significativas mais evidentes para o Cd e As.

5. CONCLUSÕES

Para o ensaio realizado verificou-se que aplicação de As e NaCl ao longo do tempo de exposição afetou negativamente a biomassa das plantas. Já no caso contaminações de Cd e Cu, não se verificou qualquer alteração no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Apenas as plantas contaminadas com Cd conduziram a uma diminuição considerável do teor de matéria seca, comparativamente aos valores obtidos nas amostras de controlo. Já as plantas contaminadas com Arsénio, obtiveram assim os valores mais elevados neste teor.

Relativamente ao teor de clorofila, observou-se um efeito negativo principalmente nas plantas contaminadas com Cd, que conduziram a valores significativamente inferiores aos das plantas de controlo, facto comprovado pelo aparecimento de cloroses nas amostras vegetais. No entanto, os maiores teores deste parâmetro foram detetados para as amostras de As e NaCl, apresentando uma coloração mais escura.

Verificou-se a acumulação nas plantas de manjerição dos diferentes PTEs estudados tendo estas apresentado valores de contaminação, ao fim de 52 dias, superiores aos valores estabelecidos por lei para produtos hortícolas de folha, especialmente para:

- Cádmio que após 52 dias: $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco; Limite máximo para cádmio: $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.
- Arsénio que ao fim de 52 dias: $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco; Limite máximo para arsenito de sódio: $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.

Os sintomas visíveis dos efeitos tóxicos do Cádmio foram detetados ao fim de 86 dias, mas isso já não aconteceu para o contaminante Arsénio, ou seja, ao longo de todo o ensaio as plantas apresentaram sempre um aspeto saudável, o que poderá constituir um risco para a saúde humana. Os elevados teores de Arsénio e capacidade que o manjerição tem em absorver e transportar este elemento para a parte aérea sem afetar o seu aspeto de forma visível, podem considerá-la como uma planta propícia à acumulação de Arsénio. Relativamente ao Cobre, a sua concentração só ultrapassou os limites por lei após 73 dias de exposição e apenas para as amostras contaminadas com Cobre (Após 73 dias: $51,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de matéria seca; Limite máximo para cobre: 5 a 20 mg kg^{-1} de matéria seca).

A partir da análise do teor mineral, verificou-se que o Cádmio absorvido aparenta estimular a absorção de Ca, Mg, Mn, K e Na e a reduzir a absorção de Cu, Fe e Zn. Quanto ao ensaio com Cobre, este elemento aparenta estimular a absorção de Ca, Mg, Mn, K, Na e Zn e a reduzir a absorção de Fe. No ensaio com Arsénio, este elemento aparenta estimular a absorção de Fe e Na e a reduzir a absorção de Ca, Cu, Mg, Mn, K e Zn. Para o ensaio com NaCl, este contaminante aparenta estimular a absorção de Fe, K e Zn e a reduzir a absorção de Ca, Cu, Mg

e Mn. Sendo assim, confirma-se que na presença de PTE e NaCl o conteúdo nutritivo das plantas de manjerição é afetado.

É importante realçar que o manjerição quando exposto a concentrações elevadas de PTE e NaCl, onde as concentrações de Cd e As foram superiores às previstas pela lei após 52 dias de exposição, apenas as amostras com Cd apresentaram alterações visíveis, como se verificou pelas cloroses e pelos baixos valores obtidos com o aparelho *Hansatech*. Por esta razão aparente, haverá rejeição do consumidor além de que ao evitar consumi-las previne efeitos graves na sua saúde. Sendo assim, torna-se relevante haver um controlo do local de cultivo e compreender o efeito destes PTE, de forma a impedir a entrada destes contaminantes na planta e consequentemente na cadeia alimentar.

5.1 Propostas Futuras

Em estudos posteriores, seria interessante determinar o teor de clorofila por espectrofotometria (método destrutivo), para melhor correlacionar e avaliar os valores obtidos pelo método *Hansatech* (método não destrutivo e com maior número de repetições), com o teor efetivo de clorofila medida no espectrofotómetro. Outros estudos seriam a determinação do teor mineral nas turfas, de forma a analisar o teor dos elementos que ficou acumulado no substrato. Também seria interessante verificar o nível de acumulação dos elementos estudados (Cd, Cu, As e NaCl) nos caules para comparar com os valores obtidos nas folhas.

Para tornar o trabalho mais enriquecido, poderiam ser feitas outras determinações relacionadas com a identificação de respostas da planta ao stresse induzido, ou seja, determinação do peróxido de hidrogénio (para identificação de ROS), determinação da malondialdeído (MDA) (para avaliar os danos causados nas membranas celulares) e determinação de atividades enzimáticas de enzimas envolvidas na resposta ao stresse oxidativo, tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidases, glutatona redutase, entre outras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. (2008). *Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants*. Journal of Plant Biology **51** (3): 167-173.
- ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICAB, J.; GARBISU, C. (2004). *Plants against the global epidemic of arsenic poisoning*. Environment International **30**: 949-951.
- ALMEIDA, D. (2006). *Manual de Culturas Hortícolas – Volume I*. Presença (Ed.). Lisboa.
- APEL, K.; HIRT, H. (2004) *Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction*. Rev. Plant Biol.
- BAPTISTA, P.; VENÂNCIO A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos*. FORVISÃO – Consultoria em Formação Integrada, LDA. Guimarães.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. (2005). *Cadmium toxicity in plants*. Plant Physiol **17** (1): 21-34.
- CARVALHO, L. (2007). *A biodiversidade nos processos de fitorremediação*. Biodiversidade e Conservação. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- CLEMENS, S. (2006). *Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of ztolerance in plants*. Biochimie **88**: 1707–1719.
- CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRÄMER, U. (2002). *A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation*. Trends in Plant Science **7**: 309-315.
- DALCORO, G.; FASANI, E.; FURINI, A. (2013). *Recent advances in the analysis of metal hyperaccumulation and hypertolerance in plants using proteomics*. Front Plant Sci. **4**: 280.
- DI TOPPI, L. S.; GABBRIELLI, R. (1999). *Response to cadmium in higher plants*. Environmental and Experimental Botany **41**: 105–130.
- DUFFUS, J. H. (2002). *Heavy Metal*. IUPAC. Pure Appl. Chem. **74** (5): 793-807.
- GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. V. (2006). *Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death*. BioEssays **28**: 1091-1101.
- GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (2010). *Manejo da salinidade na agricultura: Estudo básicos e aplicados*. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Salinidade. Fortaleza, Brasil.
- GOMES, C. (1998). *Estudo do efeito do Cádmio no Desenvolvimento de algumas espécies vegetais*. Relatório Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

- GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2005). *Making the life of heavy metal stressed plants a little easier*. *Funct Plant Biol* **32**: 481-494.
- GUIMARÃES, M. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. (2008). *Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. **3** (1): 58-68.
- HALL, J. L. (2002). *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. *Journal of Experimental Botany* **53** (366): 1-11.
- HALLIWELL, B. (2006). *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. *Plant Physiology* **141**: 312-322.
- LAMAS, M. B. C. (2012). *Efeito da exposição e acumulação de elementos potencialmente tóxicos e salinidade em Alface*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- LIN, R.; WANG, X.; LUO, Y.; DU, W.; GUO, H.; YIN, D. (2007). *Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (Triticum aestivum L.)*. *Chemosphere*.
- MARKOVSKA, Y. K.; GORINOVA, N. I.; NEDKOVSKA, M. P. & MITEVA, K. M. (2009). *Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in Brassica juncea plants*. *Biologia Plantarum* **53** (1): 151-154.
- MARTINS, L.; MOURATO, M. (2008). *Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo*. *Revista Agros, AEISA*.
- MARTINS, L.; MOURATO, M. (2006). *Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content*. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 2179-2198.
- MATTIAS, J. L. (2006). *Metais pesados em solos sob aplicação de dejetos líquidos de suínos em duas microbacias hidrográficas de Santa Catarina*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria. Brasil.
- MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. (2002). *Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species*. *New Phytologist* **154**: 29-43.
- MENDES, B.; OLIVEIRA, J.F.S. (2004). *Qualidade da água para consumo humano*. Lidel (Ed.). Lousã.
- MENGEL, K.; KIRBY, E. A. (2001). *Principles of plant nutrition*. 5ª Edição. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 593 p.

- MILNER, M. J. & KOCHIAN, L. V. (2008). *Investigating heavy-metals hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system*. *Annals of Botany*. **102**: 3-13.
- MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R. D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAKOSE, S. V.; PRASAD, M. N. V. (2006). *Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L.* *Plant Physiology and Biochemistry*.
- MITEVA, E. (2002). *Accumulation and effect of arsenic on tomatoes*. *Communications in Soil Science and Plant* **33**: 1917-1926.
- MITHOFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. (2004). *Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals*. FEBS Letters: 1–5 Publishers. Dordrecht.
- MITTLER, R. (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Review. *Plant Science*. Elsevier.
- MÖLLER, I. M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. (2007). *Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants*. Review. *Plant Biological*.
- MOREIRA, I. N. (2011). *Mecanismos antioxidantes de resposta ao stresse induzido por metais tóxicos em nabiças*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- MOURATO, M.; REIS, R.; MARTINS, L. L. (2012). *Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity*. Capítulo 2 em *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. 388 pp Ed. Giuseppe Montanaro and Bartolomeo Dichio, InTech, 388 pp. (ISBN 978-953-51-0557-2).
- NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. (2007). *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. *Physiologia Plantarum* **129**: 185-195.
- NRIAGU, J. (1998). *A silent killer of environmental metal poisoning*. *Environ Pollut* **50** (1-2): 139-161.
- OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J. (2010). *O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino*. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11. Brasil.
- PEREIRA, R. C. A.; MOREIRA, A. L. M. (2011). *Manjeriço – Cultivo e Utilização*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa.

- PINTO, F. R. (2011). *Avaliação da Resposta ao Stresse Oxidativo Induzido por Cádmio em Plantas de Espinafre (Spinacea oleracea L.)*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- PLANTAS MEDICINALES (1988). *El Dioscórides Renovado*. Editorial Labor, S.A. Herederos de P. Font Quer. Espanha-Sant Andreu de la Barca, Barcelona.
- PRASAD, M. N. V. (2004). *Heavy Metal Stress in Plants - From Biomolecules to Ecosystems*. 2nd Edition. Springer.
- RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H.; RAHMAN, M. M.; ISLAM, M. N.; MIAH, M. A. M.; TASMIN, A. (2007). *Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (Oryza sativa L.) varieties in Bangladesh*. Chemosphere **67**: 1072-1079.
- REGULAMENTO (CE) N.º 396/2005 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Fevereiro de 2005 relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal.
- REGULAMENTO (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001.
- REICHMAN, S. M. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc*. Australian Minerals & Energy Environment Foundation.
- REZANKA, T.; SIGLER, K., (2008). *Biologically active compounds of semi-metals*. Phytochemistry **69**: 585-606.
- SANDALIO, L. M.; DALURZO, H. C.; GOMEZ, M.; ROMERO-Puertas, M. C.; DEL RIO, L. A. (2001). *Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants*. Journal of Experimental Botany **52**: 2115-2126.
- SCANDALIOS, J. L. (2005). *Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses*. Brazilian Journal of Medical and Biological **38**: 995-1014.
- SILVA, H. (2006). *Determinação do teor de metais pesados em produtos vegetais frescos*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- SINGH, N. & MA, L.Q. (2006). *Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator Pteris vittata L. and non-hyperaccumulator Pteris ensiformis L.* Environmental Pollution. Elsevier. **141** (2): 238-246.
- SOARES, A. M. S. S. & MACHADO, O. L. T. (2007). *Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reactivas de oxigénio*. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. **1** (1): 9-17.

UPADHYAY, R. K.; PANDA, S. K. (2009). *Copper – induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (Pistia stratiotes L.)*. Biochemistry / Biochimie. ScienceDirect **3**: 2795.

VANGRONSVELD, J.; H. CLIJSTERS (1994). *Toxic effects of metals. In Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

VARENNE, A. (2003). *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Escolar Editora. Lisboa. 490 p.

WANG, J.; EVANGELOU, B. P.; NIELSEN, M. T. (1992). *Surface chemical properties of purified root cell walls from two tobacco genotypes exhibiting different tolerance to manganese toxicity*. Plant Physiol. **100**: 496-501.

WILLADINO, L. & CAMARA, T. R. (2010). *Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Salinidade. Recife, Brasil.

YRUELA, I. (2009). *Copper in plants: acquisition, transport and interactions*. Functional Plant Biology **36**: 409-430.

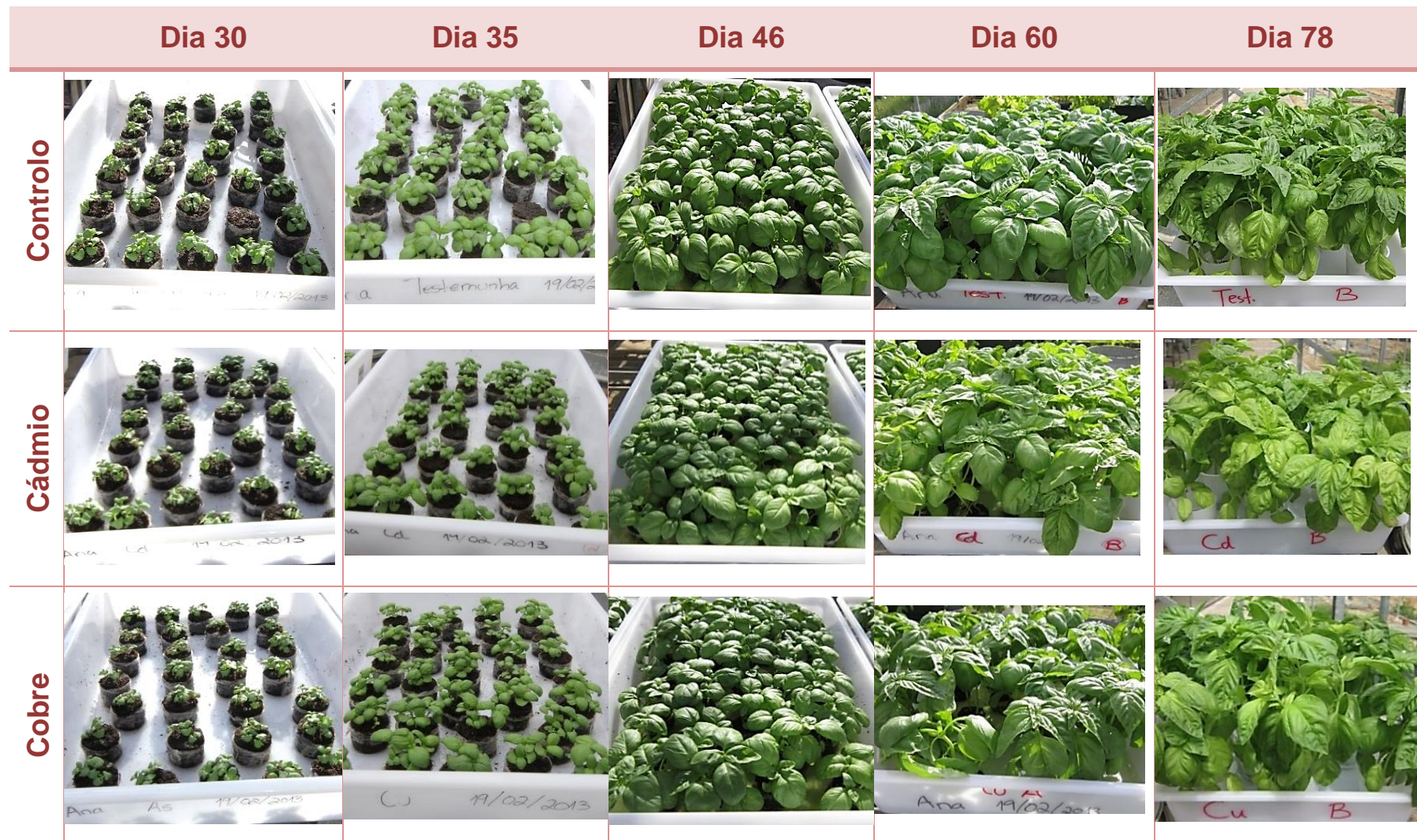
Webgrafia:


- <<http://hortas.info/como-plantar-manjerico>> acesso em: Outubro de 2013.
- <<http://www.plantarportugal.org/index.php/horticultura/1173-plantar-manjerico.html>> acesso em: Outubro de 2013.

ANEXO I – Ensaio de Crescimento nos dias de Colheitas

	Controlo	Cádmio	Cobre	Arsénio	Salinidade
Dia 52					
Dia 73					
Dia 87					
Dia 97					

ANEXO II – Ensaio de crescimento ao longo do tempo de exposição



		Dia 30	Dia 35	Dia 46	Dia 60	Dia 78
Arsénio						
Salinidade					